



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**JAK2 MUTASYONLARININ KRONİK MİYELOPROLİFERATİF
HASTALIK AYIRICI TANISINDAKİ ÖNEMİ**

GÜVEN YENMİŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
PROF. DR. AYŞE ÖZER



REPUBLIC OF TURKEY
MARMARA UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

**THE IMPORTANCE OF JAK2 MUTATIONS IN DISTINCTIVE
DIAGNOSIS OF CHRONIC MYELOPROLIFERATIVE DISORDERS**

GUVEN YENMIS
MASTER THESIS

DEPARTMENT of MEDICAL BIOLOGY

SUPERVISOR
PROF. DR. AYŞE ÖZER

İSTANBUL-2010

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Acıbadem Genetik Tanı Merkezi ve Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı işbirliğiyle gerçekleştirilmiştir.

Tezin hazırlanmasında bana duyduğu güveni kaybetmeyen, emeğinin boyutunu kelimelerle ifade edemediğim sevgili danışman hocam **Prof. Dr. Ayşe Özer'e**, çalışmalar sırasında tecrübesini benimle paylaşan sevgili hocam **Doç. Dr. Ender Altıok'a**, beni bu günlere taşıyan sevgili bölüm arkadaşım **Sevgi Karabulut** ve çalışma arkadaşım **Şirin Yüksel'e**, benden beklentisini hep yüksek tutarak beni motive eden canım **Babam'a** katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih

Güven Yenmiş

İÇİNDEKİLER

Kısaltma ve Simgeler

Şekil Listesi

Tablo Listesi

1.Özet

2.Summary

3.Giriş ve Amaç

4.Genel Bilgiler

4.1.Klasik miyeloproliferatif hastalıklar

4.1.1 Esansiyel Trombositoz

4.1.2.Polisitemia Vera

4.1.3. Miyeloid Metaplazili Miyelofibroz

4.1.4. Kronik Miyeloid Lösemi

4.2. Jak-STAT Sinyal İletim Yolağı

4.2.1. JAK Kinazlar

4.2.2. JAK2 ve kronik miyeloproliferatif hastalıklardaki patogenezi

4.3. *STAT*'lar

4.3.1. *STAT* proteinlerinin yapısal özellikleri

4.3.2. *STAT* DNA Bağlanma Bölgeleri

4.3.3. *JAK / STAT* sinyal yolağının düzenlenmesi

5. Gereç ve Yöntem

5.1. Kullanılan aletler

5.2. Kullanılan sarf malzemeleri

5.3. Kullanılan Reaktifler

5.4. Hasta örneklerinden DNA izolasyonu

5.5. Gerçek zamanlı (Real Time) PCR

5.5.1. PCR master karışımının hazırlanması

5.5.2. Reaksiyona etki eden faktörlerin ortadan kaldırılması

5.5.3. Hibridizasyon Prob Yöntemi

5.5.4. PCR programı

5.6. Testin Hassasiyeti

6. Bulgular

7. Tartışma

8. Kaynaklar

9.Özgeçmiş

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

AHSCT : Allojenik Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonu

BSA : Bovin Serum Albumin

DBD : DNA Bağlanma Bölgesi

DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü

EGFR : Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

EPO : Eritropoetin

EPOR : EPO-Bağlı Reseptör

ET : Esansiyel Trombositoz

GAS : Gamma Tarafından Etkinleşen Bölge

GCSFR : Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör Reseptörü

GH : Büyüme Hormonu

Hct : Hematokrit

HDAC : Histon Deasetilaz

IFN : İnterferon

IL : İnterlökin

JAK : Janus Kinaz

JH : JAK Homoloji

KL : Kinaz Benzeri Bölge

KML : Kronik Miyeloid Lösemi

KMPH : Kronik Miyeloproliferatif Hastalık

MAPK : Mitojen Etkili Protein Kinaz

MDS : Miyelodisplastik Sendrom

MMM : Miyeloid Metaplazili Miyelofibroz

MPH : Miyeloproliferatif Hastalık

MPL : Trombopoetin Reseptörünü Kodlayan bölge

NF-KB : Aktif lökositler nükleer transkripsiyon faktörleri

Nmi : N-myc Etkileşen Protein

PDGFR : Trombosit Türevi Büyüme Faktörü Reseptörü

Ph : Filedelfiya

PI3K : Fosfotidilinositol 3-Kinaz

PIAS : Aktif STAT'ların Protein Baskılayıcıları

PRL : Prolaktin
PRV : Polisitemia Rubra Vera
PTP : Protein Tirozin Fosfataz
PV : Polisitemia Vera
PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SAP : SAF-A / Acinus / PIAS
SHP : SH2 Bölgesi olan Fosfataz
SOCS : Sitokin Sinyal Baskılayıcıları
STAT : Transkripsiyon ve Sinyal Dönüştürücü ve Aktivatörleri
SUMO : Küçük Ubikuitin Bağlı Düzenleyici Proteinler
TAD : Karboksi Terminal Transkripsiyonel Aktivasyon Bölgesi
Tpo : Trombopoetin

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Jak-STAT sinyal yolağı.

Şekil 2. JAK ve STAT'ın yapısal gösterimi.

Şekil 3. Kronik Miyeloproliferatif hastalık patogeneğinde JAK2 ve etkisi

Şekil 4. STAT1' in kristal yapısı. DNA'ya bağlanmış bir STAT1 çekirdek dimerinin (136-710 aminoasit) kurdelesel görünümü.

Şekil 5. Farklı PIAS proteinleri farklı mekanizmalarla JAK / STAT yolaklarını baskılayabilirler.

Şekil 6. Hibridizasyon Prob Yöntemi

Şekil 7. Hastaların Karşılaştırılması

Şekil 8. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış örneklerin melting curve analiz sonuçları

TABLO LİSTESİ

- Tablo 1.** ET için Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından önerilen güncellenmiş tanı kriterleri
- Tablo 2.** Kronik Miyeloid Hastalıkların kısmi-moleküler sınıflandırılması
- Tablo 3.** Primer ve Reaktif Trombositoz Nedenleri
- Tablo 4.** Polisiteminin Sınıflandırılması
- Tablo 5.** PV için DSÖ tarafından önerilen güncellenmiş tanı kriterleri
- Tablo 6.** PV'nin tedavi algoritması
- Tablo 7.** Kemik iliği fibrozu nedenleri
- Tablo 8.** MMM için DSÖ tarafından önerilen güncellenmiş tanı kriterleri
- Tablo 9.** Miyeloid Metaplazili Miyelofibroz Risk Tablosu
- Tablo 10.** Test hassasiyeti için hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki örnekler
- Tablo 11.** KMPH'da hasta sayısına göre JAK2V617F mutasyon varlığı bulguları
- Tablo 12.** JAK2V617F ve BCR/ABL varlığı sorgulanan hasta bulguları
- Tablo 13.** Yıllara göre JAK2V617F mutasyonunun hasta sayısına göre dağılımı
- Tablo 14.** Hasta JAK2V617F sonuçları ve Literatür Karşılaştırması
- Tablo 15.** JAK2V617F mutasyonunun BCR-ABL ile ilgili sonuçları ve literatür ile karşılaştırılması.
- Tablo 16.** Yıllara göre JAK2V617F mutasyonu saptanan hasta oranları

1. ÖZET

Miyeloproliferatif hastalıklar, mutant multipotent hematopoetik kök hücre kaynaklı olan birçok kronik hematolojik hastalığı bünyesinde barındırmaktadır. Son çalışmalarda, JAK2 geninde oluşan V617F somatik mutasyonu, polisitemia vera, esansiyel trombositoz ve idiyopatik miyelofibroza rapor edilmiştir. JAK2 bir sitoplazmik tirozin kinazı kodlamaktadır. JAK homoloji 2 (JH2) negative regülatör bölgesinde meydana gelen V617F mutasyonunun, JAK2 kinaz etkinliğini arttırdığı ve sitokinden bağımsız büyümeye neden olduğu hücre serileri ve kültür ortamındaki kemik iliği hücrelerinde gösterilmiştir.

Polisitemia vera (PV), esansiyel trombositoz (ET) ve miyeloid metaplazili miyelofibrozu (MMM) hastalıklarında keşfedilen *JAK2V617F* mutasyonları bu hastalıkları ileri düzeyde anlamak adına çok önemli bir gelişme olarak kabul edilmiştir. Çoğu PV ile birçok ET ve MMM hastaları *JAK2V617F* mutasyonu açısından pozitif olup, bu mutasyon hematopoetik kök hücrelerde meydana gelmektedir. JAK2 aktif bir tirozin kinaz olup, JAK/STAT yolağını eritropoetin reseptörü (EPOR), trombopoetin reseptörü veya granülosit koloni-uyarıcı faktör reseptörü (GCSFR) ile birlikte daha etkin aktive edilebilir özelliğine sahiptir. Kemik iliği transplantasyonu ile *JAK2V617F* mutasyonu oluşturulmuş fare çalışmalarında, mutasyonun PV veya miyelofibrozu tetiklediği gösterilmiş, kronik miyeloproliferatif hastalık patogenezinde merkezi bir rol üstlendiği desteklenmiştir. Bu çalışmada, *JAK2V617F* mutasyon varlığının kronik miyeloproliferatif hastalıkların ayırıcı tanısındaki önemini gösterilmesi amaçlanmıştır. Mutasyonun somatik olması, hassasiyetin önem kazanmasını sağlamış, bu yüzden çalışmada hibridizasyon prob yöntemini takip eden melting curve analizi tercih edilmiştir. Elde edilen bulgular, mutasyonun dağılımı, mutasyonunun etkileri ve endikasyon kriterlerinin önemine işaret etmiş, yaş, cinsiyet, yeterli hastalık hikayesi gibi etkenler de kullanılarak daha kapsamlı bir çalışma yapılmasını zorunlu kılmıştır.

Anahtar Sözcükler

Esansiyel Trombositoz, *JAK2V617F* mutasyonu, Kronik miyeloproliferatif hastalık, Miyeloid metaplazili miyelofibrozu, Polisitemia Vera

2. SUMMARY

THE IMPORTANCE OF JAK2V617F MUTATION IN DISTINCTIVE DIAGNOSIS OF CHRONIC MYELOPROLIFERATIVE DISORDERS

The myeloproliferative disorders comprise a spectrum of chronic hematologic diseases that are likely to arise from a mutant multipotent hematopoietic stem cell. In recent researches, V617F somatic mutation in the Janus kinase 2 gene (*JAK2*) has been detected in polycythemia vera, essential thrombocythemia or idiopathic myelofibrosis patients. This gene encodes a cytoplasmic tyrosine kinase. V617F mutation, which occurs in the JAK homology 2 (JH2) negative regulatory domain, is shown to increase the JAK2 kinase activity thus causing cytokine-independent growth in cell lines and cultured bone marrow cells.

The identification of *JAK2V617F* mutation in polycythemia vera (PV), essential thrombocytosis (ET), and myelofibrosis (MF) represents an important advance in understanding these myeloproliferative disorders (MPD). Most patients with PV and a significant number of patients with ET or MF are *JAK2V617F* positive, the mutation likely to be arising in the hematopoietic stem cell lineage. JAK2 is a constitutively active tyrosine kinase that is able to activate JAK / STAT signaling most efficiently when co-expressed with erythropoietin receptor (EPOR), the thrombopoietin receptor (MPL), or the granulocyte colony-stimulating factor receptor (GCSFR). Data from murine models supports the central role of JAK2V617F in the pathogenesis of MPD, as expression of JAK2V617F in a bone marrow transplantation assay results in polycythemia and myelofibrosis in recipient mice. This study is intended to show the importance of the presence of JAK2V617F mutation in distinctive diagnosis of chronic myeloproliferative disorders. Because the mutation is somatic, the sensitivity has become more significant and melting curve analysis following the hybridization prob method has been preferred. The resulting findings has pointed to the importance of mutation distribution, mutation effects and indication criteria and it has made it necessary to do a more comprehensive study using the factors such as the age, gender and sufficient disorder story.

Key Words

Essential thrombocytosis, JAK2V617F mutation, Chronic myeloproliferative disorders, Myelofibrosis with myeloid metaplasia, Polycythemia vera

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Teknolojinin bilimin ayakları altına serdiği olanakların artması, daha önce aynı kategoride değerlendirilen; ama günümüzde net çizgilerle ayrılabilen hastalık sayısındaki artış, doğru tanı kriterlerinin kullanılmasını, hastanın hastalığının erken teşhisine ve tedavisine geçilmesine olanak sağlamıştır. Tanı için hekim bazlı tanı kriterlerinin varlığı hastaya konulan tanıların hekime göre değişiklik göstermesine sebep olmakta, kimi zaman geri dönüşü olmayan sorunlara sebep olmaktadır. Tıbbın önüne geçilemez bir ivme kazandığı günümüzde tanı için kullanılan kriterlerin bir standart yakalaması gerekliliği inkar edilemez bir boyuta ulaşmıştır. Çalışmamız bu standardın önemine ve gerekliliğine işaret etmektedir. Çalışmamızda JAK2V617F mutasyon varlığının kronik miyeloproliferatif hastalıkların ayırıcı tanısındaki önemini gösterilmesi amaçlanmıştır. Yeni bilimsel gelişmelerle tıp alanında da birbirine benzer hastalıklar birbirinden net çizgilerle ayrılmaya başlamıştır. Bu bağlamda tıbbi genetik bu ayrımı yapmada önemli bir rol üstlenmektedir. Özellikle hematolojik hastalıkların birbirine benzer hikayeleri hastalığa yaklaşımda ve tedavi sürecinde aksaklıklara ve beklenmedik sonuçlara sebep olabilmektedir. 2005 yılında bulunan bir somatik mutasyon –JAK2V617F- kronik miyeloid hastalıkları, benzer hastalıklardan ayırmak için kullanılan anahtar bir rol üstlenmektedir. Öyle ki bu mutasyon, miyeloproliferatif hastalıkları diğer hastalıklardan ayırmada akla ilk gelen çözüm olmaktadır. Özellikle PV’da yaklaşık %95 oranında görüldüğü düşünülünce bu hastalığın ayırıcı tanısı için gerekliliği kaçınılmaz görünmektedir. Saptandığı ilk günden günümüze; tanındıkça mutasyonun, temel kriter olarak kullanılması kaçınılmaz olmuş, sadece KMPH şüphesi durumunda bile varlığı sorgulanmıştır. Bu mutasyon, günümüzde artık sadece KMPH tanısı için değil, diğer benzer hastalıkları KMPH’dan ayırmada da vazgeçilmez olmaktadır. Mutasyon varlığının hastaların endikasyon bilgisiyle doğrudan ilişkili olabileceği, yanlış tanı ya da kullanılan hastalık tanı kriter farklılığının mutasyonun hastalık içerisindeki dağılıma etkisinin boyutu sorgulanmıştır. Hekimlerin mutasyon sorgularken KMPH şüphesi taşıdıkları ya da KMPH’ı dışlamak için böyle bir yol izledikleri netleşmeden mutasyonun popülasyon içerisindeki dağılımı konusunda doğru ve kesin bir bilgiye ulaşmak da mümkün görünmemektedir. Çalışmanın, hekimler

arasındaki farklı tanı kriterlerinin bir standarda sahip olmasının gerekliliği konusunda literatüre katkı yapması beklenmektedir.

4.GENEL BİLGİLER

4.1.Klasik miyeloproliferatif hastalıklar

Miyeloproliferatif hastalık (MPH) terimi ilk kez 1951'de Dameshek (Dameshek 1951) tarafından esansiyel trombositemi (ET), polisitemia vera (PV), miyeloid metaplazili miyelofibroz (MMM) ve kronik miyeloid lösemi (KML)'deki klinik-patolojik benzerlikleri ortaya koymak için kullanılmıştır. Daha sonra, bu hastalıkların miyeloid ve lenfoid hücre serilerini kapsayan ve biyolojik olarak birbiriyle ilişkili klonal kök hücre hastalıkları oldukları fark edilmiştir (Fialkow et al 1967, Barr and Fialkow 1973, Adamson et al 1976, Fialkow et al 1977, Fialkow et al 1978, Jacobson et al 1978, Martin et al 1980, Fialkow et al 1981). Diğerlerinden farklı olmak üzere bunlardan sadece KML'de hastalığa sebep olan bir mutasyon (*bcr/abl*) saptanmıştır (Nowell and Hungerford 1960). Tanımlamada kolaylık sağlaması amacıyla diğer 3 hastalık (ET, PV ve MMM) *bcr/abl*-negatif klasik MPH'lar olarak sınıflandırılarak *bcr/abl* varlığıyla tanı konulan Kronik Miyeloid Lösemi (KML)'den, miyeloid, granülosit ve megakaryositik elemanların her üçünde hematopoezin durmasıyla karakterize olan miyelodisplastik sendromdan (MDS) ve heterojen kategori olup diğer bütün kronik miyeloproliferatif hastalıkları içeren "atipik" MPH'dan ayrılmışlardır. Bu sınıflandırma, MDS'de daha nadir görülen bir somatik nokta mutasyonu (Janus kinaz 2 [*JAK2*] mutasyonu, JAK2V617F) ile desteklenmektedir (Baxter et al 2005, James et al 2005, Jones et al 2005, Kralovics et al 2005, Levine et al 2005, Steensma et al 2005, Zhao et al 2005) (**Tablo 2**).

4.1.1 Esansiyel Trombositoz

4.1.1.1. Tanı

Kullanılan ET tanı kriteri dirençli, reaktif olmayan trombositoz (normal trombosit sayısındaki artış) ve hemen sonrasında ET benzeri KML, PV, MDS ve MMM (hücre sel fazdaki dahil) gibi diğer miyeloid hastalıkların dışlanmasıdır (Schafer 2004, Tefferi and Murphy 2001, Murphy et al 1997) (**Tablo 1**).

Trombositozu olan bir hastaya yaklaşımda ilk olarak reaktif trombositoz (RT) olasılığı dikkate alınmaktadır (Robbins and Barnard 1983, Santhosh-Kumar et al

1991, Buss et al 1994, Yohannan et al 1994, Chen et al 1999, Chuncharunee et al 2000) (Tablo 3).

Tablo 1. ET için Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından önerilen güncellenmiş tanı kriterleri (Tefferi et al 2007)

1. Devam eden trombosit sayısında artış, $\geq 450 \times 10^6 / L$,
 2. Kemik iliği biyopsisinde özellikle genişlemiş, olgun megakaryosit sayısında artış ve nötrofil granülopoezinde ya da eritropoezde önemli bir artışın olmaması,
 3. PV, KML, MDS ve diğer miyeloid neoplazmlara ait DSÖ kriterlerini karşılamamak,
 4. JAK2V617F mutasyonu ya da diğer klonal belirteçlerin bulunması ya da herhangi bir klonal belirteçin olmaması durumunda reaktif tromboz bulgusunun gözlemlenmemesi,
- Tanı için 4 kriterin mutlak varlığı gerekmektedir.

4.1.1.2. Prognoz ve Tedavi

Esansiyel trombositemide neredeyse normal bir yaşam standardı gözlemlendiğinden hiçbir tedavi yöntemi sağkalım süresini arttırma amaçlı olmamaktadır (Rozman et al 1991, Passamontiet al 2004). Vasküler sorunları önleyici tedavi, tromboza neden olan risk faktörlerinin varlığı ve yokluğuna göre değişiklik göstermektedir (Tefferi and Murphy 2001). Mikrovasküler belirtiler, düşük doz (40-100 mg) aspirin ile kontrol altında tutulmaktadır (McCarthy, Eichelberger, Skipworth and Danielson 2002).

Tablo 2. Kronik Miyeloid Hastalıkların kısmi-moleküler sınıflandırılması
(Tefferi and Gilliland 2006)

1. Miyelodisplastik Sendrom
2. Miyeloproliferatif Hastalıklar

Klasik Olanlar

I. Moleküler olarak tanımlanmış Kronik Miyeloid Lösemi

II. Klinik-patolojik olarak belirlenmiş (*bcr/abl* ve sıklıkla $JAK2^{V617F}$ ile ilişkili olan)

1. Esansiyel trombositemi
2. Polisitemia vera
3. Miyeloid metaplazili miyelofibroz

Atipik Olanlar

I. Moleküler olarak tanımlanmış

1. PDGFRA-yeniden düzenlenmiş eozinofilik/mast hücre hastalıkları (*FIP1L1-PDGFR A* vb)
2. PDGFRB- yeniden düzenlenmiş eozinofilik hastalıklar (*TEL/ETV6-PDGFR B* vb)
3. *c-kit* mutasyonu ile ilişkilendirilen sistemik mastositoz (*c-kit^{D816V}*)
4. 8p11 miyeloproliferatif sendrom (*ZNF198/FIM/RAMP-FGFR1* vb.)

II. Klinik-patolojik olarak belirlenmiş (daha az $JAK2^{V617F}$ mutasyonu görülen)

1. Kronik nötrofilik lösemi
2. Kronik eozinofilik lösemi, moleküler olarak tanımlanmamış
3. Hipereozinofilik sendrom
4. Kronik bazofilik lösemi
5. Kronik miyelomonositik lösemi
6. Juvenil miyelomonositik lösemi (*PTPN11* ve *NF1* gibi RAS sinyalizasyon yolağı mutasyonlarıyla ilişkilendirilmiş)
7. Sistemik mastositoz, moleküler olarak tanımlanmamış
8. Sınıflandırılmamış miyeloproliferatif hastalıklar
(JAK 2: Janus Kinaz 2, PDGFR: Trombosit türevi büyüme faktörü reseptörü)

Tablo 3. Primer ve reaktif trombositoz nedenleri (Robbins and Barnard 1983, Santhosh-Kumar et al 1991, Buss et al 1994, Yohannan et al 1994, Chen et al 1999, Chuncharunee et al 2000)

Primer Trombositoz	Reaktif Trombositoz
Esansiyel Trombositemi	Enfeksiyon
Polisitemia Vera	Doku hasarı
Miyeloid Metaplazili Miyelofibroz (belirgin)	Kronik enflamasyon
Miyeloid Metaplazili Miyelofibroz (hücresele fazda)	Tümör varlığı
Kronik Miyeloid Lösemi	Düzelme fazındaki trombositoz
Miyelodisplastik Sendrom	Renal hastalıklar
Akut Lösemi	Hemolitik anemi
	Splenektomi sonrası dönem
	Kan kaybı

4.1.2. Polisitemia Vera

4.1.2.1. Tanı

Genel olarak, hematokrit (Hct) düzeyinin yükselmesi, eritrosit üretiminde gerçek bir artışı göstermiyor olabilir (**Tablo 4**).

Tablo 4. Polisiteminin sınıflandırılması (Tefferi 2003)

Görünür polisitemi

Relatif polisitemi (Isbister 1987)
Aşırı “yüksek-normal” değerlerde (Fairbanks and Tefferi 2000)
Gerçek Polisitemi
Polisitemia vera (Tefferi 2003)

Sekonder polisitemi

A. Konjenital

I. Yüksek ya da normal serum EPO (eritropoetin) düzeyi ile ilişkilendirilmiş
a. Hippel-Lindau gen mutasyonu ile ilişkili Chuvash ve diğer polisitemiler (otozomal resesif) (Ang et al 2002)
b. Yüksek oksijen-eğilimli hemoglobinopati (otozomal dominant) (Moo-Penn et al 1980)
c. 2,3-Difosfogliserat mutaz eksikliği (otozomal resesif) (Galacteros et al 2005)
d. Patogenetik olarak tanımlanamayan vakalar (Cario 2005, Gordeuk et al 2005)
II. Düşük serum EPO düzeyiyle ilişkilendirilmiş
EPO reseptörünü etkinleştiren mutasyon (otozomal dominant) (Sokol et al 1995)

B.Sonradan Kazanılmış

I. EPO Aracılı
Hipoksi sebepli
Merkezi Hipoksik Proses
1. Kronik Akciğer Hastalığı (Vanuxem et al 1977)
2. Sağdan-sola kardiyopulmoner vasküler şantlar (Tyndall et al 1987)
3. Yüksek rakımda yaşam alanı (Milledge and Cotes 1985)
4. Karbon Monoksit (CO) zehirlenmesi (DiMarco 1988)
5. Sigara içen polisitemisi (uzun dönemli CO maruz kalma) (Smith and Landaw 1978)
6. Azalan solunum sendromları (uyku apnesi vb) (Hoffstein et al 1994)
Perifer Hipoksik Proses
1. Sınırlandırılmış
2. Renal arter daralması (Hudgson et al 1967)
b. Hipoksiden bağımsız (patolojik EPO üretimi)
Kötü huylu tümörler
1. Hepatohücrel karsinom (Ndububa et al 1999, Matsuyama et al 2000)

2. Renal hücre kanseri (Wiesener et al 2002)
3. Beyincik hemangiyoblastoması (Skultety et al 1970)
4. Paratiroid karsinom (Weinstein 1991)
Habis olmayan durumlar
1. Rahim leiomyomaları (Suzuki et al 2001)
2. Renal kistler (polikistik böbrek hastalığı) (Jermanovich 1983)
3. Feokromositoma (Drénou et al 1995)
4. Meningiyoma (Bruneval et al 1993)
II. Kimyasal Etkenli
EPO alımı (Spivak 2001)
Androjen preparatlarıyla tedavi (Dickerman et al 1998)
III. Bilinmeyen Mekanizmalar
Post-renal transplant eritrositoz (Wickre et al 1983, Glicklich et al 1999, Mrug et al 2004)

Geleneksel olarak PV tanısı, PV çalışma grubunun ana kriterine göre -artmış kırmızı kan hücre kütlesi- ile konulmaktadır (Wasserman 1971). Günümüzde yanlış tanıyı önlemek amacıyla, PV çalışma grubu kriteri olan artmış kırmızı kan hücre kütlesi yerine öncelikli olarak klinik durum, serum EPO düzeyi ve Kİ histolojisi değerlendirmeye alınmaktadır (Tefferi 2003).

PV'de serum EPO değeri genellikle düşük olup, normal olarak da seyredebilir (Cotes et al 1986, Messinezy et al 2002, Mossuz et al 2004), ancak neredeyse hiçbir vakada yüksek değer saptanmamıştır (Messinezy et al 2002, Mossuz et al 2004).

Düşük serum EPO düzeyi, PV'nin morfolojik olarak ispatlanabilmesi için kemik iliği biyopsisini ve JAK2V617F mutasyonu taramasını zorunlu kılmaktadır (Thiele et al 2001, Baxter et al 2005, James et al 2005, Kralovics et al 2005, Levine et al 2005). Etkinleşen JAK2 tirozin kinaz PV hastalarının neredeyse hepsinde görülürken, sekonder eritrositozu olanlarda saptanmaz (Baxter et al 2005, James et al 2005, Kralovics et al 2005, Levine et al 2005). Bu yüzden polisiteminin diğer sebeplerini dışlamada JAK2V617F mutasyonunun taranması tavsiye edilmektedir (Tefferi and Barbui 2005).

Normal serum EPO düzeyine sahip hastalarda kemik iliği biyopsisi ve JAK2V617F mutasyonu taraması gerekliliği, PV'yi işaret eden diğer klinik (kaşıntı, eritromegali, splenomegali, arteryel ya da ven trombozu) ya da laboratuvar göstergelerine (trombositoz, lökositoz, artmış lökosit alkalın fosfataz değeri, yüksek Hct değeri) bağlıdır (Tefferi and Barbui 2005).

Tablo 5. PV için DSÖ tarafından önerilen güncellenmiş tanı kriterleri (Tefferi et al 2007)

<p>A. Temel (Majör) Kriterler</p> <ol style="list-style-type: none">1. Hemoglobın düzeyinin erkeklerde 18.5 g/dL, kadınlarda 16.5 g/dL'den yüksek olması ya da artan kırmızı hücre hacmini gösteren diğer kanıtlar,2. JAK2V617F mutasyonu ya da JAK2 ekson 12 mutasyonu gibi fonksiyonel olarak benzer başka mutasyonların varlığı, <p>B.Yardımcı (Minör) Kriterler</p> <ol style="list-style-type: none">1. Kemik iliği biyopsisinde 3 farklı hücre serisinde (eritroid, granülosit ve megakaryosit) yoğun artış,2. Serum eritropoetin (Epo) düzeyinin normal referans aralığındaki değerin altında olması,3. <i>In vitro</i> ortamda endojen eritroid koloni oluşumu, <p>Tanı için her iki majör kriter ve bir minör kriterin varlığı veya birinci majör kriter ve iki minör kriterin varlığı gereklidir.</p>
--

4.1.2.2.Prognoz ve Tedavi

Güncel olarak PV'da belirlenen risk faktörleri ve risk katmanları ET'dekilere benzemektedir (**Tablo 4**) (Berk et al 1995, Gruppo Italiano Studio Policitemia 1995). PV tedavisinin temel taşı flebotomi oluşturmaktadır (Hedef hct değeri, erkeklerde <45 ve kadınlarda %42) (**Tablo 5**) (Berk et al 1995). Flebotomiden başka tek başına sağkalımı arttıracak bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır (Berk et

al 1995). Doğurgan yaştaki kadınlarda interferon-alfa (IFN- α) kullanımı yaygındır. Güncel bir çalışmada, yan etkinin söz konusu olmadığı durumlarda, PV hastaları için düşük doz aspirin önerilmektedir (European Collaboration on Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera Investigators 2004). **Tablo 6**, PV'nin tedavi algoritmasını göstermektedir.

Tablo 6. PV'nin tedavi algoritması (Tefferi 2003)

Düşük Risk	Flebotomi ve düşük doz aspirin	Uygun değil	Flebotomi ve düşük doz aspirin
Orta Risk	Flebotomi ve düşük doz aspirin	Uygun değil	Flebotomi ve düşük doz aspirin
Yüksek Risk	Flebotomi + hidroksiüre ve düşük doz aspirin	Flebotomi + hidroksiüre ve düşük doz aspirin	Flebotomi + interferon alfa ve düşük doz aspirin

4.1.3. Miyeloid Metaplazili Miyelofibroz

3.1.3.1 Tanı

Tipik MMM, displastik megakaryositik hiperplazi, kolajen ve retikülin fibrozu, osteoskleroz ve intrasinüsodal hematopoez ile karakterize olmaktadır. Hücre faz MMM'de, kemik iliği fibroz derecesi minimal olabilmekte, fakat splenomegali, miyeloftizis ve artmış laktik asit dehidrogenaz düzeyi sıklıkla saptanmaktadır. Kemoterapi görmemiş MMM hastalarının yaklaşık %50'sinde sitogenetik bozukluklar görülmektedir (Tefferi 2001). Bunlardan en yaygın olanları: del(20)(q11;q13), del(13)(q12;q22), trizomi 8, trizomi 9, t(1;7), del(12)(p11;p13), kromozom 7'de monozomi ya da uzun kol(q) delesyonları ve trizomi 1q'dur (Reilly et al 1997, Tefferi 2001).

Tablo 7. Kemik iliği fibrozu nedenleri

Hematolojik Hastalıklar		Hematolojik Olmayan Hastalıklar
Miyeloid	Lenfoid	
Miyeloid metaplazili miyelofibroz (Tefferi 2000)	Tüylü hücre lösemisi (Shehata et al 2004)	Metastatik kanser (Kiely and Silverstein 1969)
Kronik miyeloid lösemi (Buesche et al 2003)	Hodgkin lenfoma (Meadows et al 1989)	Oto-immun miyelofibrozu (Paquette, Meshkinpour and Rosen 1994)
Miyelodisplastik sendrom (Steensma, Hanson, Letendre and Tefferi 2001)	Non-Hodgkin lenfoma (Matsunaga et al 2004)	Sistemik lupus eritemotoz (Inoue et al 1992)
Kronik miyelomonositik lösemi (Tefferi, Hoagland, Therneau and Pierre 1989)	Multipl Myelom (Meerkin, Ashkenazi, Gottschalk-Sabag and Hershko 1994)	Kala-azar (Rocha Filho et al 2000)
Kronik eozinofilik lösemi (Michel et al 1991)		Tüberküloz (Viillard et al 2002)
Sistemik mastositoz (Baek, Li, Pardanani, Butterfield and Tefferi 2002)		Papet hastalığı (Murrin and Harrison 2004)
Akut megakaryositik lösemi (Ruiz-Arguelles et al 1986)		HIV enfeksiyonu (Sitalakshmi, Srikrishna and Damodar 2003)
Diğer akut miyeloid lösemiler (Mori et al 2000)		Renal osteodistrofi (Nomura et al 1996)
Akut lenfositik lösemi (Wallis and Reid 1989)		Hiperparatiroidizm (Kumbasar et al 2004)
Akut miyelofibroz (Thiele, Krech, Vykoupil and Georgii 1984)		Gri trombosit sendromu (Falik-Zaccai et al 2001)
Habis histiositoz (Hasselbalch 1990)		Ailesel infantil miyelofibroz (Sheikha 2004)

Tablo 8. MMM için DSÖ tarafından önerilen güncellenmiş tanı kriterleri (Tefferi et al 2007)

A. Temel (Majör) Kriterler

1. Megakaryosit sayısında artış ve retikülin ve/ya kolajen fibrozu eşliğinde megakaryositik değişikliklerin varlığı. Retikülin fibrozunun yokluğunda megakaryositik değişikliklerle birlikte granülositik artışla karakterize, artmış kemik iliği hücre sayısının gözlemlenmesi.
2. PV, KML, MDS ve diğer miyeloid neoplazmlara ait DSÖ kriterlerini karşılamamak,
3. JAK2V617F mutasyonu ya da diğer klonal belirteçlerin (örn. MPL515W>L/K) bulunması ya da herhangi bir klonal belirtecin olmaması durumunda enflamatuvar ya da başka neoplastik hastalık kaynaklı kemik iliği fibrozu bulgusunun gözlemlenmemesi,

B.Yardımcı (Minör) Kriterler

1. Lökoeitroblastoz,
2. Serum laktat dehidrogenaz seviyesinde artış,
3. Anemi,
4. Somut splenomegali,

Tanı için üç majör kriter ve iki minör kriterin varlığı gereklidir.

4.1.3.2 Prognoz ve Tedavi

Klinik bulgulardaki ve prognozdaki benzerlikler nedeniyle, post-polisitemik miyeloid metaplazi ve post-trombositemik miyeloid metaplaziye, agnojenik miyeloid metaplaziye benzer şekilde yaklaşılmaktadır (**Tablo 8**). Genel olarak, MMM'de ilaç tedavisinin sağkalım süresi üzerinde etkisi gösterilememiş, ilaç tedavisi sadece belirtileri hafifletme amacıyla uygulanmıştır. Benzer şekilde, hem

splenektomi hem bölgesel radyasyon tedavisi MMM tedavisinde hafifletici roller üstlenmişlerdir. Allojenik hematopoetik kök hücre transplantasyonunun (AHSCT) etkili olarak uygulanabildiği gösterilmiştir. Sonuç olarak, tanımlanan risk faktörleri AHSCT için uygun hastaları seçmek amacıyla kullanılmaktadır (**Tablo 9**) (Dupriez et al 1996, Cervantes et al 1997, Tefferi et al 2001).

Tablo 9. Miyeloid Metaplazili Miyelofibrozu risk tablosu (Tefferi and Barbui 2005).

Kategori	Hemoglobin <10g/dL (175,176)	Yapısal belirtiler (175)	Dolaşımdaki blast >%1 (175)	Beyaz Kan hücresi >30x10 ⁹ /L ya da <4x10 ⁹ /L (176)	13q- ya da 20q- dışındaki sitogenetik bozukluklar (173)
Düşük	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
Orta	Yukarıdaki özelliklerden 1 tanesinin olması durumunda				
Yüksek	Yukarıdaki özelliklerden 2 veya fazlasının olması durumunda				

Birbirinden bağımsız 5 faktör düşük sağkalım süresi ile ilişkilendirilmiştir: Bu bulguların yokluğunda, ortalama sağkalım süresi 10 yıla kadar uzamaktadır. Ortalama sağkalım süresi, bu bulguların birinin varlığında 5-10 yıl, en az ikisinin varlığında 5 yılın altında olmaktadır (**Tablo 9**) (Dupriez et al 1996, Cervantes et al 1997, Tefferi et al 2001).

4.1.4. Kronik Miyeloid Lösemi

KML, her çeşit erişkin ya da erişkin olmayan granülositin birikimiyle – lökositoz – karakterize olan bir hematopoetik kök hücre hastalığıdır. KML klasik olarak Philedelphia (Ph) kromozomunun varlığı ile ilişkilendirilmiştir (Faderl et al 1999). Kromozom 9’da proto-onkogen c-abl içeren bölge ile kromozom 22’de bcr lokusundaki kırılma noktasında bulunan genetik materyalin resiprokal translokasyonu ile karakterize olup ilk defa 1960’da Nowell ve Hungerford tarafından tanımlanmıştır. Bu değişim, KML’nin tanı kriteri olup hastaların %95’inde bulunmaktadır. Bazı KML hastalarında translokasyon kırılma noktasına yakın, büyük delesyonlar görülebilmekte, böyle hastaların prognozu zayıf olmaktadır (Sinclair et al 2000).

Abl proteinleri sinyal iletiminde ve hücre büyümesi regülasyonunda önemli role sahip non-reseptör tirozin kinazlardır (Wang 1993). ABL ve BCR’daki farklı yapısal

bozukluklar bcr/abl'nin lösemik dönüşümünü kolaylaştırmaktadır. Oluşan füzyon ürünü bcr/abl, artan ve regülasyonu bozulan tirozin kinaz etkinliğiyle p210 olarak adlandırılan bir füzyon proteinini kodlamaktadır. Normal P145^{ABL}'in etkinliği ve hücre içi lokalizasyonu integrinler ile regüle edilmektedir.

BCR/ABL;

a) bir mitojen olarak çalışıp Ras sinyal iletim yolağını etkinleştirerek, c-myc ve c-fos'un artışına ve dolaylı olarak gen transkripsiyonunda artışa (Verfaillie 1998) ve siklin-D kompleksi aktivasyonuna neden olur (Afar, McLaughlin, Sherr, Witte and Roussel 1995). Siklin bağımlı kinazlar hücre döngüsünde hücrelerin G1 fazından S fazına geçmesine olanak sağlar.

b) Apoptozu engelleyerek hücre birikimine neden olur (Bedi, Zehnauer, Barber, Sharkis and Jones 1994).

c) a4b integrinleri normal öncül hücrelerin ilik mikro ortamında yapışmasını ve böylece öncül proliferasyon ve farklılaşmanın gerçekleştirilmesini sağladıkları için önemlidirler. BCR/ABL, normal integrin etkinliğini azaltarak öncül hücrelerin stromal elemanlara yapışmasını engeller. Böylece kök hücreler fizyolojik inhibitör regülasyonundan kaçabilmektedirler (Verfaillie 1998).

Hastalık dönüşümü, diğer sitogenetik ve moleküler değişiklikler ile karakterize olmaktadır. En yaygın sitogenetik değişiklikler trizomi 8, izokromozom 17q ve çift Ph kromozomudur (Mitelman 1993).

4.1.4.1. Tedavi

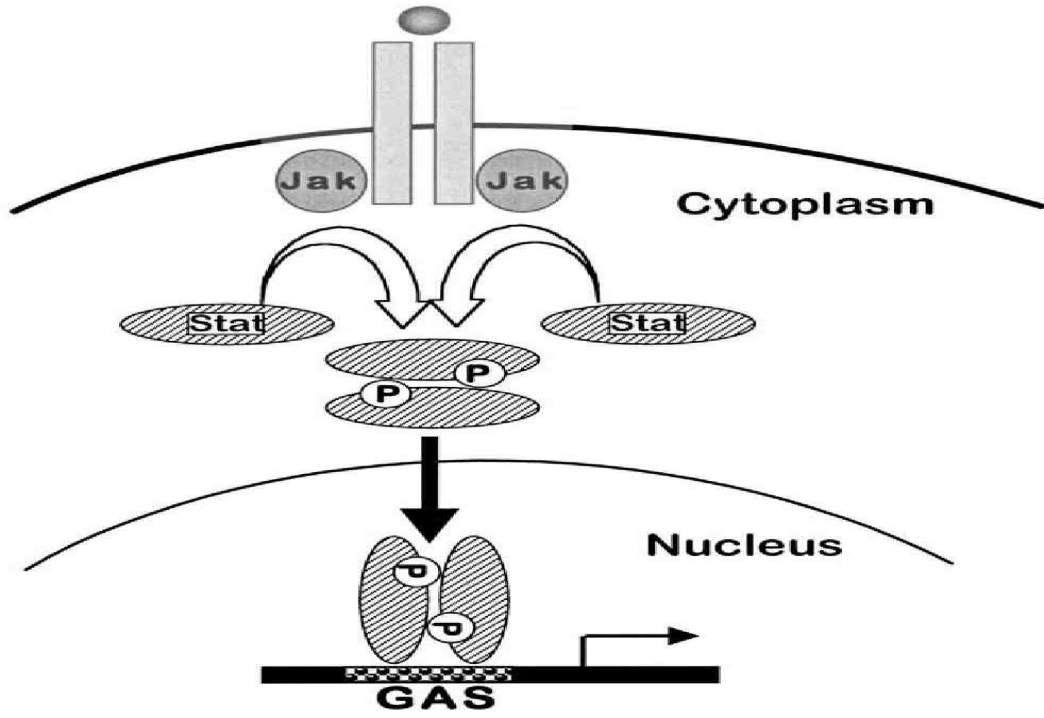
Hidroksiüre KML tedavisinde ilk kez 1972 yılında kullanılmış, iyi toksisite grafiği KML'de tercih edilen bir ajan olmasını sağlamıştır (Rushing, Goldman, Gibbs, Howe and Kennedy 1982). 1980'lerde IFN'nin hastalık üzerindeki etkisi keşfedilmiş ve günümüzde en yaygın KML tedavi ajanı olarak kabul görmüştür.

4.2 Jak-STAT Sinyal İletim Yolağı

Sitokinler bazı hematopoez ve immün yanıtlarının düzenlenmesini sağlar. Bu düzenlemeleri JAK / STAT sinyal yolağının aktivasyonu ile gerçekleştirirler. STAT' lar (transkripsiyon ve sinyal dönüştürücü ve aktivatörleri) (Stat1, 2, 3, 4, 5a, 5b ve 6) yapısal ve fonksiyonel benzerlikleri olan 7 farklı üyeli bir protein ailesidir. JAK'lar

(Janus Kinaz) (Jak1, Jak2, Jak3 ve Tyk2) reseptör-olmayan tirozin kinaz ailesinin 4 üyesidir. Bu kinazlar belirli STAT'ları fosforile ederek aktif hale geçirirler. STAT aktifleştikten sonra kalıtsal ve edinilmiş immün cevapları düzenlemede kritik bir rol üstlenir. En az iki STAT sinyal iletiminin düzensizliği hücresel başkalaşım ile ilişkilidir.

STAT'lar, sitokinlerin büyük hematopoetin alt grubu ve bağlandıkları korunmuş reseptör aileleri için sinyal iletirler. Bunlar IFN ailesini (IFN- α/β , IFN- γ , interlökin IL-10, IL-19, IL-20, IL-22), gp130 ailesini (IL-6, IL-11, OSM, LIF, CT-1, G-CSF, IL-12, IL-23, Leptin, CTNF, NNT-1/BSF-3), γ C ailesini (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21) ve reseptörlerin tek zincir ailesini [Epo, GH, PRL (Prolaktin), Tpo (Trombopoetin)] kapsamaktadır (Schindler and Strehlow 2000). STAT'lar ayrıca epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGF-R), CSF-1R ve PDGF-R gibi tirozin kinaz reseptörleri ile de aktive edilebilirler (Leonard and O'Shea 1998, Schindler and Strehlow 2000). JAK / STAT yolağındaki sinyal iletimi sitokinin ilgili reseptöre bağlanmasıyla tetiklenir (Kisseleva et al 2002). Bu durum reseptörün sitoplazmik bölümünde yapısal değişikliklere neden olur ve böylece reseptöre bağlı JAK ailesi kinazlarının aktifleşmesine olanak sağlar. Buna karşılık JAK'lar, özgül tirozin reseptör rezidülerinde fosforilasyonu düzenleyerek daha sonra STAT'lar ya da diğer sinyal iletici moleküllerin bağlanabileceği alanlar oluşturur. Reseptöre bağlanan STAT'lar da JAK tarafından tek tirozin rezidüleri üzerinden fosforile edilir. Aktif STAT'lar, reseptörden ayrılır, dimerize olur, çekirdeğe geçer ve enhancer dizisi ailesinin GAS (Gamma Tarafından Etkinleşen Bölge) üyelerine bağlanır (**Şekil 1**).

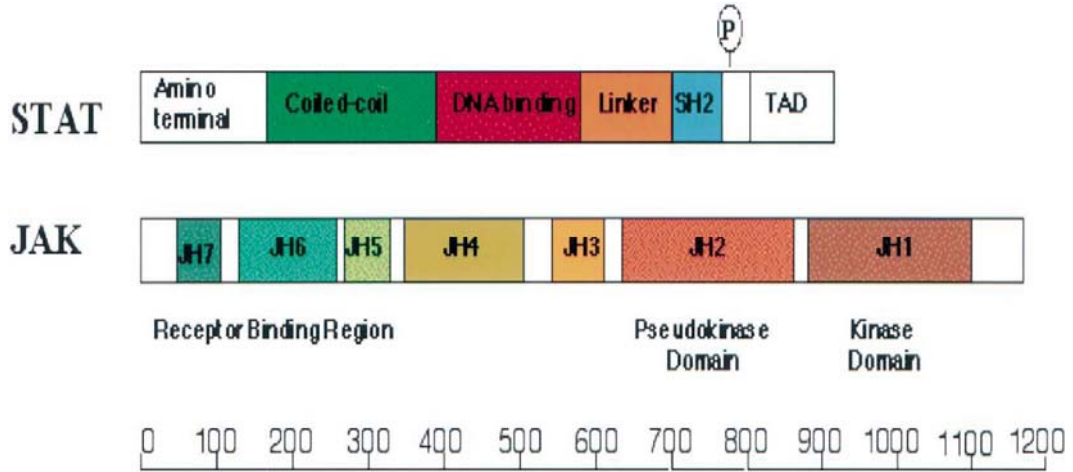


Şekil 1. Jak-STAT sinyal yolağı. Ligand bağlandıktan hemen sonra, sitokin bağlı JAK’lar etkinleşir. Etkinleşen JAK’lar daha sonra STAT’ları fosforlar ve etkinleştirir. Aktif STAT’lar reseptörden ayrılır, dimerik yapı oluşturur, çekirdeğe geçer ve GAS “enhancer” ailesine bağlanır. (Kisseleva et al 2002)

4.2.1 JAK Kinazlar

4.2.1.1. JAK yapısı

JAK dizilerinin karşılaştırılması ile 7 bölgenin yüksek homoloji, JH1-JH7 gösterdiği saptanmıştır (Şekil 2) (Kisseleva et al 2002). Bu bölgelerin biyolojik aktiviteleri tam olarak anlaşılacakla beraber bazı bölgeler çok iyi tanınmaktadır (Leonard and O’Shea 1998, Ihle 2001). JH1’in kinazı kodladığı gösterilmiştir. JH2’nin bir psödökinaz bölgeye işaret ettiği ve JH1’in katalitik aktivitesi için gerekli olduğu belirtilmiştir (Yeh, Dondi, Uze and Pellegrini 2000). Amino-terminal JAK homoloji bölgeleri (JH3-JH7) reseptör bağlanmasıyla ilişkilidir. Fakat, JH7 bölgesinin bu etkileşimdeki rolü henüz açıklanamamıştır.



Şekil 2. JAK ve STAT'ın yapısal gösterimi. JAK'lar JH1-JH7 gibi yüksek homoloji gösteren bölgelere sahiptir. JH1' in kinazı kodladığı gösterilmiştir. JH2, JH1 in katalitik aktivitesini düzenleyen bir psödökinaz bölgesidir. JH3-JH7 reseptör bağlanmasından sorumludurlar. STAT'lar da JAK'lar gibi, bir amino terminal bölgesi (NH₂), bir burgulanmış-burgu bölgesi, bir DNA bağlanma bölgesi (DBD), bir bağlayıcı bölge, bir SH2 bölgesi ve bir tirozin aktivasyon bölgesi (P ile işaretli) gibi birçok korunmuş bölge içerirler. Karboksi terminal transkripsiyonel aktivasyon bölgesi (TAD) fonksiyonel olarak korunmuş olsa da dizide korunmamıştır. (Kisseleva *et al* 2002).

4.2.1.2. Amino terminali

Amino-terminal JAK bölgesi 550 aminoasit içerir ve aile üyeleri içerisinde farklılık gösterir. N-terminal bölgesi işlevsel olarak reseptör bağlanmasından ve bu bağlanmanın özgüllüğünden sorumludur (Leonard and O'Shea 1998, Ihle 2001). Son zamanlarda kullanılan yapısal modellemeler JH3-JH4 bölgelerinin SH2 bölgesiyle bazı benzerlikler gösterdiğini ve JH4-JH7 bölgesinin protein-protein etkileşimini sağlayan FERM bölgesi ile homoloji gösterdiğini kanıtlamıştır (Girault, Labesse, Mornon and Callebaut 1998).

4.2.1.3. Psödökinaz bölgesi

Psödökinaz bölgesinin varlığı JAK'ları diğer protein tirozin kinazlardan ayırır (Ihle 2001). Bu kinaz benzeri bölge (KL), bona fide tirozin kinazın katalitik aktivitesi dışındaki tüm yapısal özelliklerine sahiptir. KL'nin rolü net olarak açıklanamamış olsa da kinaz bölgesinin aktivitesini düzenlediğine dair bulgular

artmaktadır. Örneğin, KL delesyonu Jak2'nin hiperaktivasyonuna neden olur. Bu olay *Drosophila* JAK'ı Tum-1 için de rapor edilmiştir (Leonard and O'Shea 1998). *Drosophila* JAK'daki bu işlev arttırıcı mutasyon bir hematosit tümöre neden olmaktadır (Velazquez et al 1995, Yeh et al 2000).

4.2.1.4. Tirozin kinaz bölgesi

JH1'deki korunmuş kinaz bölgesi bir tirozin kinazın klasik özelliklerini taşır (Hubbard and Till 2000). Aktivasyon döngüsünün en önemli bölümünü oluşturan korunmuş tirozinleri de kapsar; JAK1'de Y1038/Y1039, JAK2'de Y1007/1008, JAK3'de Y980/981, Tyk2'de Y1054/Y1055 (Leonard and O'Shea 1998). Bu ikili tirozinin fosforilasyonu konformasyonel bir değişikliğe sebep olarak substrat bağlanmasını kolaylaştırır (Hubbard and Till 2000).

4.2.2. JAK2 ve kronik miyeloproliferatif hastalıklardaki patogenezi

Jak2 fonksiyonu ilk olarak biyokimyasal yaklaşımlar ile ele alınmıştır. Bu çalışmalarda tek zincirli reseptörler (Epo-R, Tpo-R, GH-R, PRL-R vb.), IL-3 reseptör ailesi (IL-3R, IL-5R ve GM-CSF-R), gp130 reseptör ailesi ve sınıf II reseptör sitokin ailesi üyeleri aracılığıyla gerçekleşen sinyal iletiminde JAK2'nin fonksiyonu olduğu gözlemlenmiştir (Schindler and Strehlow 2000). Jak1'in aksine, Jak2 knockout sıçanlar gebeliğin 12,5. gününde embriyonik fetal fenotip sergilemiştir. Analog olarak Epo - / - knockout sıçanlarda görüldüğü gibi, ölümler mutlak eritropoez yokluğuyla ilişkilendirilmiştir (Wu et al 1995, Neubauer et al 1998, Parganas et al 1998). Bu çalışmalar Epo sinyal iletimi için JAK2 etkinliğinin gerekli olduğunu ortaya koymuştur. Yine bu çalışmalarda, Jak2'nin Epo dışında IL-3, GM-CSF, IL-5, Tpo ve IFN- γ iletim yollarında da etkin olduğu gösterilmiştir (Kisseleva, Bhattacharya, Braunstein and Schindler 2002).

JAK2'nin psödökinaz bölgesindeki (JH2) Valin 617, JAK2'nin kinaz bölgesiyle (JH1) önemli bir benzerlik gösterirken, katalitik etkinlikten yoksundur. JAK2 JH2'nin delesyonu, JAK2 kinaz etkinliğinin artışına neden olur (Saharinen, Takaluoma and Silvennoinen 2000). Bu psödökinaz bölgesinin, FLT3'teki gibi

reseptör tirozin kinazın juxtamebran bölgesindeki oto-inhibitör role benzer bir rol üstlendiği düşünülmektedir (Griffith et al 2004).

JAK/STAT sinyal iletim yolağı hücresel proliferasyon ve hücre sağ kalımında kritik rollere sahiptir (Levy and Darnell 2002, Benekli et al 2003, Melzner et al 2005). Örneğin, JAK2 knock-out sıçanlarda, hematopoezde miyeloid öncüller tarafından verilen mutlak eritrositoz ve sitokin yanıtının olmadığı gösterilmiştir (Parganas et al 1998, Krempler et al 2004). JAK2'nin kinaz bölgesi, hematopoetik hücrelerde bcl-2 üretimini uyararak anti-apoptotik sinyalleri düzenler (Sakai and Kraft 1997). JAK/STAT sinyal yolağını ya da bu yolağın düzenleyici elemanlarını etkileyen anomaliler, hematolojik maligniteleri de içeren birçok tümör fenotipiyle ilişkilendirilmiştir. Mesela, eşey hücre öncüllerindeki JAK3 mutasyonları otozomal resesif bir hastalık olan SCID (ağır bağışıklık yetmezliği sendromu)'in birçok formuyla ilişkilendirilmiştir (Macchi et al 1995, Yamaoka et al 2004).

Birçok çalışma, MPH'da, JAK/STAT yolağının hastalığın patogenezinde ve Epo bağımsız fenotipte ve/veya hipersensitivitesinde etkin olduğunu göstermiştir (Prchal and Axelrad 1974, Golde et al 1977, Zanjani et al 1977). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, PI3 kinaz, JAK2/STAT5 ve Src kinaz sinyal yolaklarının Epo-bağımlı ve Epo-bağımsız eritroid farklılaşmasında anahtar rol oynadıkları gösterilmiştir (Ugo et al 2004). Benzer şekilde, Epo reseptörünü (EpoR) aktiveştiren mutasyonlar, JAK2 ve STAT5'in temel fosforilasyonu ile ilişkilendirilmişlerdir (Arcasoy, Harris and Forget 1999).

Biyokimyasal sonuçlar, JAK2'nin temel olarak aktif bir tirozin kinaz olduğunu desteklemektedir. JAK2V617F aleli, 293T hücrelerinde çok düşük seviyede eksprese edildiğinde dahi, temel kinaz aktivitesiyle uyumlu olarak, oto-fosforilasyona neden olmaktadır (Levine et al 2005). Bununla birlikte, JAK2V617F ve yabanıl tip JAK2 alelleri ile yapılan *in vitro* çalışmalarda, JAK2V617F alelli örneğin oto-fosforilasyon ve substrat düzeyinde fosforilasyon ile kinaz aktivitesinde önemli bir artış gösterdiği saptanmıştır (Zhao et al 2005).

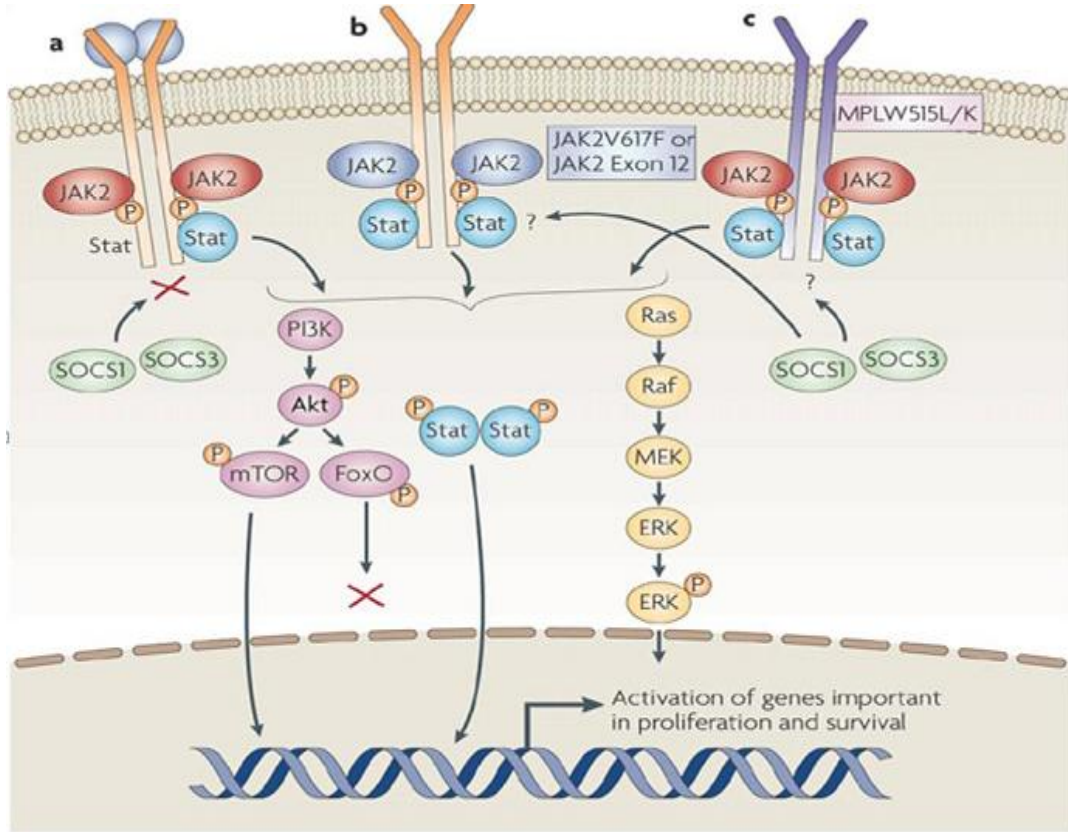
In vitro ve *in vivo* bulgular JAK2V617F alelinin PV gelişimi için yeterli olduğunu gösterse de; PV, ET ve MMM'nin patogenezinde başka genetik olayların da etken olabileceğini gösteren kanıtlar bulunmaktadır.

Fenotipik özellikleri benzer, klinik olarak farklı miyeloproliferatif hastalığı olan 3 hastada JAK2 alelinin saptanmış olması bu benzer fenotipleri açıklamak için başka genetik ve epigenetik olguların varlığına işaret etmektedir. Buna ek olarak, yakın zamanda elde edilen genetik bulgular, kalıtılan alellerin MPH patogeneziyle, JAK2 mutasyonuna bağımlı olmaksızın ilişkili olabileceğini göstermiştir. Bir çalışmada, ailesinde birden fazla MPH olan bireylerde JAK2V617F mutasyonu için tarama yapılmış ve pozitif MPH aile hikayesi olan bu bireylerin tamamında somatik JAK2V617F mutasyonuna rastlanmamıştır (Bellanne-Chantelot et al 2006). Bazı ailelerde hem JAK2V617F-pozitif hem JAK2V617F-negatif hasta bireyler bulunmuş ve herhangi bir PV, ET ya da MMM tanılı olmayan yakın aile bireylerinde JAK2V617F aleli yokluğunda, endogen eritroid koloni oluşumu gözlenmiştir. Bu bulgular, JAK2 mutasyonunun durumundan bağımsız olarak, PV, ET ve MMM patogenezinde henüz tanımlanmamış başka mutasyonların varlığını desteklemekte ve tetikleyici olayların JAK2V617F kazanımından önce olabileceğini düşündürmektedir (Prchal 2006).

JAK2 hücre çeperinden başlayan ve çekirdek içine kadar devam eden bir sinyalizasyon yolunun temelini oluşturur. Hematopoez bu sinyalizasyon yolağı ile gerçekleşir. Buna göre aktivasyonunun artması kan hücresi sayısında artışa, azalması kan hücre sayısının azalmasına işaret etmektedir. JAK2 tirozin kinazını kodlayan JAK2 genindeki mutasyon ligand bağlanmasına gerek kalmadan kinazın etkinliğini sağlamakta kontrol mekanizmasını devre dışı bırakmakta, miyeloproliferatif hastalık oluşmasına sebep olmaktadır. Bu mutasyon JAK2 bölgesinde gerçekleştiğinde uyarı kesintisiz devam etmekte ve transkripsiyon durmamaktadır. SOCS1 ve SOCS3 molekülleri (Sitokin Sinyal Baskılayıcıları), negatif regülatörler olsalar da JAK2V617F aleli SOCS3'ü kullanarak bu baskıdan kurtulabilmektedir (**Şekil 3a**) (Levine, Pardanani, Tefferi and Gilliland 2007).

JAK2 ekson 12 mutasyonları da benzer etki yapmakta, etkin hale geçen kinaz sinyalizasyonu devamlı olarak uyarmakta kan hücresi sayısında artışa sebep olmaktadır. JAK2 ekson 12 mutasyonlarının SOCS1 ve SOCS3 ile nasıl bir etkileşim içerisinde olduğu netlik kazanmamıştır (**Şekil 3b**) (Levine et al 2007).

Trombopoetin reseptörünü kodlayan MPL geninde W515 L ya da W515K mutasyonları da özellikle MMM hastalarında görülmekte, kontrolsüz etkin hale geçen reseptör transkripsiyon uyarımına durmaksızın devam etmektedir. (Şekil 3c) (Levine et al 2007).



Şekil 3. Kronik Miyeloproliferatif hastalık patogenezinde JAK2 ve etkisi (Levine et al 2007). **a)** Sitokin ligandlar sitokin reseptörlerine bağlanır ve Janus Kinaz 2 ile STAT sinyalizasyon proteinleri fosforilasyonu gerçekleşir. Bu etkinlik, devam eden aşamalarda STAT sinyalizasyon faktörleri, mitojen-etkili protein kinaz (MAPK) sinyalizasyon proteinleri ve fosfotidilinositol 3-kinaz (PI3K)-Akt yolağıyla taşınır. **b)** JAK2V617F ya da JAK2 ekson 12 mutant kinazlar, sitokin reseptörlerine bağlanırlar ve ligand olmadan etkinleşirler. Bu etkinlik, sinyalizasyonun ligand-bağımsız gerçekleşmesine sebep olur. **c)** MPL W515L/K mutant trombopoetin reseptörleri yabancıl tip JAK2' yi trombopoetin yokluğunda bile uyarabilmekte, JAK2 kinaz sonrası süreçte iletim basamaklarının devamlı olarak etkinliğini ve kontrolsüz protein ekspresyonunu sağlamaktadır.

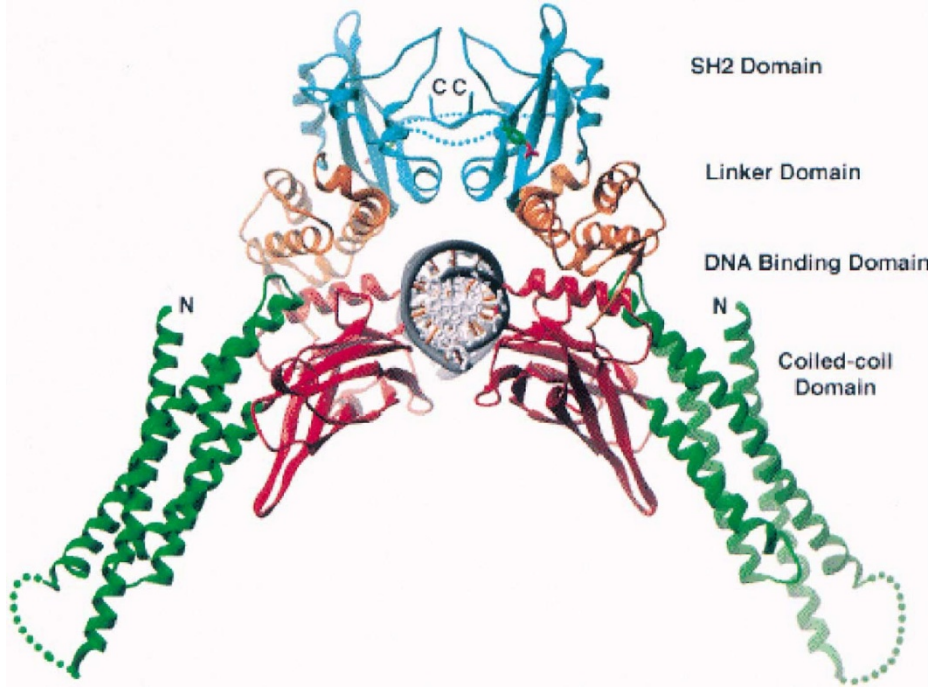
4.3. STAT'lar

Memelilerde 750-850 aminoasit uzunluğunda 7 farklı STAT proteini tanımlanmıştır. Hem kromozomal dağılımları hem de en ilkel ökaryotlarda bile bulunmuş olmaları bu ailenin tek bir primordiyal gen kaynaklı olduğunu düşündürmektedir. Bu lokusun duplikasyonu ökaryotların kompleks hale geldikçe daha çok hücreler arası iletişime ihtiyaç duydukları gerçeğini yansıtmaktadır. Bu evrimsel motifle uyumlu olarak, STAT'lar korunmuş yapısal ve işlevsel bölgelere sahiptir (**Şekil 2**). Bunlar amino terminal bölgesi (NH₂), burgulu burgu bölge (coiled-coiled domain), DNA bağlayan (binding) bölge, bağlayıcı (linker) bölge ve SH₂ / tirozin aktivasyon bölgelerini kapsar. Buna karşılık, karboksi-terminal transkripsiyonel aktivasyon bölgesi (TAD) oldukça farklılık gösterir ve STAT özgülüğünden sorumludur (Kisseleva et al 2002).

4.3.1 STAT proteinlerinin yapısal özellikleri

4.3.1.1 N-Terminal bölgesi

130 aminoasitten oluşan N-terminal bölgesi, STAT'lar arasında korunmuş bölgedir (Stat1 ile Stat4 arasındaki benzerlik: %51, Stat5 ile Stat6'da %20). Birbirinden bağımsız katlanmış, stabil bir yapı olup, bütün molekülden limitli proteoliz ile kesilebilir (Vinkemeier et al 1996). Stat4'ün kristal yapıdaki N-terminali bir dimer oluşturur (**Şekil 3**) (Vinkemeier, Moarefi, Darnell and Kuriyan 1998). Bu dimerin ara yüzeyi 5 kısa heliksten oluşan halka şeklindeki elementten oluşmaktadır. Bazı çalışmalar N-terminal dimerizasyonunun GAS elementlerine bağlanmada etkili olduğunu göstermiştir (Vinkemeier et al 1996, Xu et al 1996, Vinkemeier et al 1998). Diğer çalışmalar ise N-terminal STAT bölgesinin transkripsiyonel koaktivatör CBP/p300 (Horvath 2000), PIAS ailesi (Aktif STAT'ların Protein Baskılayıcıları) (Shuai 2000) ve reseptör bölgeleriyle (Leung et al 1996, Murphy et al 2000) etkileşimine katkıda bulunduğuna ve nükleus translokasyonunu düzenlediğine işaret etmektedir (Strehlow and Schindler 1998).



Şekil 4. STAT1' in kristal yapısı. DNA'ya bağlanmış bir STAT1 çekirdek dimerinin (136-710 aminoasit) kurdelesel görünümü. Burgulu burğu bölge yeşille, DNA bağlanma bölgesi kırmızıyla, bağlayıcı bölge turuncuyla, SH2 ve tirozinle fosforlanmış kuyruk bölgeleri maviyle gösterilmiştir. Burgulu burğu bölgede farklı yönlü iki düğüm ve SH2 bölgesini bağlayan bölge noktalı çizgilerle gösterilmiştir. DNA iskeleti gri renkle gösterilmiştir. N ve C sırasıyla STAT1'in çekirdek dimerinin N- ve C- terminal bölgelerini göstermektedir. (Kisseleva et al 2002).

4.3.1.2. Burgulu Burgu Bölge (Coiled-coil domain)

Bir esnek polipeptit zincir (Stat1 için 24 aminoasit, Stat3 için 18 aminoasit) N terminal bölgesini yaklaşık 135-315 aminoasit içeren ve 4 alfa-heliksten oluşan burgulu burğu bölgesine bağlar (*Şekil 4*). Stat1 ve Stat3'ün kristal yapısı, bu bölgenin ana iskeletten 80 A° luk bir açı yaptığını göstermiştir (Becker et al 1998, Chen et al 1998). Bu yapı, diğer helikal proteinlerle etkileşimin olabileceği oldukça geniş hidrofilik yüzeyler oluşturur. Etkileşen proteinler p48/IRF9, transkripsiyon faktörü c-Jun, N-myc etkileşen protein (Nmi) ve StIP'tir (Horvath et al 1996, Zhang et al 1999, Zhu et al 1999, Collum et al 2000). Son zamanlarda burgulu burğu

bölgesinin reseptör bağlanmasında, tirozin fosforilasyonunda ve nükleus dışına taşınmada etkili olduğu gösterilmiştir (Begitt et al 2000, Zhang et al 2000).

4.3.1.3. DNA Bağlanma Bölgesi

DNA bağlanma bölgesi, yaklaşık 320-480 aminoasit uzunluğunda olan immunoglobulin katlamalı bir β -barreldir ve burgulu burgu bölgesinin karboksi terminal tarafındadır (**Şekil 4**). Bu yapı NF-KB (Aktif lökositler nükleer transkripsiyon faktörleri) ve p53 DNA bağlanma bölgelerine benzemektedir (Chen et al 1998). Dimerin her STAT elemanı en yakın GAS elementi yarısındaki bazı tanır. Aminoasit rezidüleriyle DNA arasındaki doğrudan temas bölgeleri, nanomolar düzeyde bir ayrılma katsayısı ile tutarlıdır. Bu yüzden DNA bağlanmasındaki iş birliği, etkili transkripsiyonel aktivite için önemlidir. Ayrıca, DNA bağlanma bölgesinin aktivasyon öncesinde sergilediği farklı yapı, farklı fonksiyonları da olduğunu düşündürmektedir (McBride, McDonald and Reich 2000).

4.3.1.4. Bağlayıcı Bölge

Stat1'de 488-576 aminoasit, Stat3 de 465-585 aminoasit büyüklüğünde olan bağlama bölgesi DNA bağlanma bölgesini SH2 / dimerizasyon bölgesine bağlar (Fig 4). Stat1'in kristal yapısı bağlama bölgesinin heliks α 10 bölümünün SH2 bölgesiyle, heliks α 6'nın ise DNA bağlanma bölgesinin β 11 bölümüyle etkileştiğini göstermektedir (Chen et al 1998). Mutasyonel çalışmalar, Stat1'in bağlama bölgesinin transkripsiyonel düzenlemede de etkili olduğuna işaret etmiştir (Yang, Wen, Haspel, Zhang and Darnell 1999).

4.3.1.5. SH2 Bölgesi ve Tirozin Aktivasyon Motifi

SH2 bölgeleri özgül fosfotirozin motiflerine bağlanma kapasiteleriyle sinyal iletiminde önemli bir rol oynamaktadır. Bu durumla uyumlu olarak, en iyi korunmuş STAT bölgesidir. *Dictyostelium*'un SH2 bölgesi bulunan ilk SH2'dir (Kawata et al 1997). STAT SH2 bölgesinin (yaklaşık 580-680 aminoasit) dizisi diğer SH2'lerden farklı olmasına rağmen, yapısı çok iyi korunmuştur. 2 heliks arasında uzanan antiparalel β -katmanı ile birlikte bir cep görünümündedir. Fosfatla etkileşimi sağlayan mutlak korunmuş arginin, bu cebin zemininde yer almaktadır (Stat1 için Arg-602, Stat3 için Arg-609). SH2 bölgesinin özgül fosfotirozin motiflerini tanıması

3 STAT sinyalizasyonunda önemli rol oynar: (1) Özgül reseptör fosfotirozin motiflerinin tanınmasıyla, sitokin reseptörüne bağlanması (**Tablo 2**); (2) Aktifleşen JAK ile birleşme (Gupta et al 1996, Barahmand-Pour 1998); ve (3) STAT homo- ya da heterodimerizasyonu (Shuai et al 1994, Gupta et al 1996). Kristal yapıları ile vurgulanmış olduğu gibi, STAT dimerizasyonu, bir STAT monomerinin SH2 bölgesi ile başka bir monomerin tirozini fosforilize olmuş kuyruk bölgesi arasındaki etkileşime bağlıdır (Chen et al 1998).

4.3.1.6. Transkripsiyonel Aktivasyon Bölgesi

Özgün transkripsiyonel yanıtları düzenliyor olmasıyla uyumlu olarak, STAT'ların karboksi terminalleri çok az korunabilmiştir. Karboksi terminalin transkripsiyonel aktivasyon bölgesini (TAD) kodladığına dair ilk bulgu, normal uzunluktaki bir Stat1 ile alternatif izoformu (karboksi terminalinden 38 aminoasit eksik) Stat1 β ile yapılan karşılaştırmalı çalışmada elde edilmiştir (Schindler et al 1992). C-terminali kesilmiş birçok Stat3, Stat4 ve Stat5 izoformları da tanımlanmıştır (Schindler and Strehlow 2000). Bu izoformlar dominant-negatif düzenleyiciler olarak çalışmaktadırlar.

4.3.2 STAT DNA Bağlanma Bölgeleri

IFN yanıtlarının incelenmesi, STAT hedef genlerinin promotör elemanlarında iki farklı transkripsiyonel “enhancer” dizisinin olduğunu göstermiştir (Kessler et al 1988, Decker et al 1997, Schindler and Brutsaert 1999). Tip I IFNlar (α , β , ω , Limitin) ISGF-3 kompleksi oluşturarak sinyal iletirler (Kessler et al 1988). IFN Tip II, ayrı bir yanıt elemanına (GAS) bağlanan Stat1 homodimerleri ile sinyal iletir (Decker et al 1997). Bu palindromik eleman konsensus bir diziyeye (TTTCNGGAAA) sahiptir. Biyokimyasal çalışmalar DNA'ya bağlanmayan Stat2 dışındaki bütün STAT'lar için TTCN₂₋₄ GAA dizisinin en uygun bağlanma bölgesi olduğunu göstermiştir (Decker et al 1997, Ehret et al 2001).

4.3.2.1. Stat5

Stat5 (Stat5a) bir prolaktin-indüklenmiş transkripsiyon faktörü olarak keşfedilmiştir. IL-3 indüklenmiş transkripsiyon faktörünün tanımlanması ve cDNA

taraması amacıyla yapılan biyokimyasal çalışmalar iki yakın dizi olan Stat5a ve Stat5b'nin keşfine neden olmuştur (Azam et al 1995, Mui et al 1995). Bu proteinler birbirine bağlı, %96'lık benzerlik gösteren ve sadece karboksi terminalleriyle birbirinden ayrılan iki gen olan Stat5a ve Stat5b tarafından kodlanmaktadır (Schindler and Strehlow 2000). Art arda yapılan çalışmalarda, iki Stat5 proteinin de bütün dokularda eksprese edildiği gösterilmiştir. PRL'ye ek olarak, Stat5 proteinleri IL-3 ailesi (IL-3, IL-5 ve GM-CSF), IL-2 ailesi (IL-2, IL-7, TSLP, IL-9, IL-15 ve IL-21), GH, Epo ve Tpo ile de aktifleşmektedir (Arnould et al 1999, Schindler and Strehlow 2000, Asao et al 2001).

4.3.3. JAK / STAT sinyal yolağının düzenlenmesi

JAK/STAT yolağı savunma, farklılaşma, proliferasyon ve onkogeneizde çok önemli role sahiptir. Bu yüzden birçok olumlu ve olumsuz düzenleyici aşama bu yolağa etki eder. Bu düzenleyici aşamaların etkileri STAT sinyallerinin iletilme hızını belirler.

4.3.3.1. STAT sinyalizasyonunda olumsuz düzenleyici aşama

Birçok çalışmada, STAT sinyallerinin reseptörler, JAK'lar ve STAT moleküllerinin de içinde bulunduğu bazı durumlarda, etkileşim şiddetini azaltarak düzenleme yaptığı gözlenmiştir.

4.3.3.2 Reseptörler

Hücreler reseptörlerinin uzun süreli aktivasyonunu engellemek için bazı mekanizmalar geliştirirler. Limitli ligand miktarıyla rekabet için çözünebilir reseptör üretimi bunlardan biridir. Bu izoformlar proteoliz ya da alternatif RNA splicing yoluyla oluşturulur. Daha yaygın bir downregülasyon mekanizması reseptör endositozunu gerektirir. Bu durumla uyumlu olarak, gp130'un hücre içi bölgesinde endositozu düzenleyen korunmuş 10 aminoasitlik bir motif bulunmaktadır (Dittrich et al 1996).

4.3.3.3 Programlanmış yıkım

Ubiquitin-proteozoma bağlı yıkım da sitokin sinyalizasyonunun etki azaltarak tepkimenin dengelenmesinde bir role sahip olabilir. Proteozom

inhibitörlerinin uyarılmış hücrelerdeki Stat1 ve IFN- γ reseptörlerinin yıkımını engellediği gösterilmiştir (Haspel et al 1996, Kim and Maniatis 1996). Yeni yapılan çalışmalarda proteozom inhibitörlerinin özellikle Stat4, Stat5 ve Stat6'nın tirozini fosforlanmış izoformlarını stabilize ettiği, fakat Stat1, Stat2 ve Stat3 üzerinde etkisiz olduğu saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmalarda Stat5'te yıkıma katkıda bulunan bir karboksi terminali olduğu keşfedilmiştir (Wang et al 2000). Proteozom inhibitörleri JAK aktivasyon süresini de uzatmaktadır (Yu and Burakoff 1997, Callus and Mathey-Prevot 2000).

4.3.3.4. JAK defosforilasyonu

JAK aktivasyonu tirozin fosforilasyonuna bağlıdır. Bu yüzden, benzer SH2'ye sahip fosfatazlar olan SHP1 ve SHP2 JAK aktivitesini olumsuz düzenler. SHP1'in ekspresyonu hematopoetik dokularla sınırlı olup, SHP2 daha geniş alanlarda eksprese olmaktadır (Yi et al 1993, Jiao et al 1997). SHP1'i Epo reseptörüne bağlayan reseptör tirozin motiflerinin kaybı JAK aktivitesini uzatır (Klingmuller et al 1995). Ayrıca, bu bölgede meydana gelen bir mutasyon (JAK2V617F) ailesel eritrositoza neden olmaktadır (Chapelle et al 1993). IL-3, IL-5 ve GM-CSF için sinyal ileten ortak β -zinciri için de benzer gözlemler yapılmıştır (Yi et al 1993). SHP1 ve SHP2'nin doğrudan JAK'lar ve Stat5 ile etkileşerek defosforile ettiği bilinmektedir (Yi et al 1993, Yu et al 2000). Membran boyunca uzanan fosfataz olan CD45'in IL-3, IL-4, EPO ve IFN- γ ile uyarılmış JAK / STAT yolağını olumsuz düzenlediği gösterilmiştir (Irie-Sasaki et al 2001).

4.3.3.5. Negatif geri-besleme döngüsü

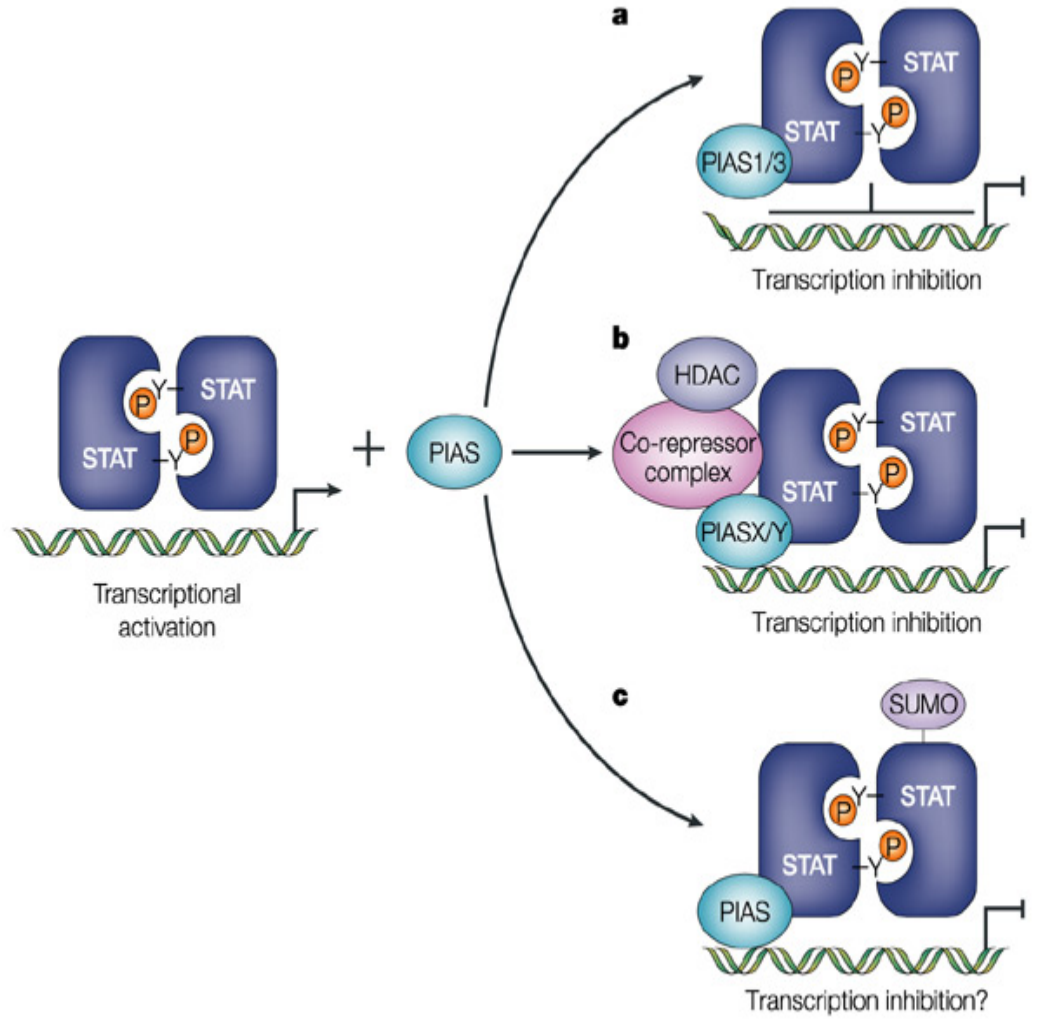
JAK / STAT yolağı yardımcı proteinleri dışında üç negatif regülatör ana sınıfı bulunmaktadır: SOCS, PIAS ve PTPler (Protein tirozin fosfatazlar) (Greenhalgh and Hilton 2001). Bunlar içinde tirozin fosfatazlar en basittir ve JAK'ların etkinliğini tersine çevirirler.

SOCS proteinleri C-terminal bölgesinde bir SOCS kutusu ve bir SH2 bölgesi olan en az sekiz üyeli bir ailedir (Alexander 2002). Ayrıca, SOCS1 ve SOCS3'de SH2 bölgesine göre N-terminalde bulunan küçük bir kinaz baskılayan bölüm tanımlanmıştır. SOCS'lar JAK / STAT yolağında basit bir negatif geri-besleme

döngüsünü tamamlar: Meydana gelen SOCS proteinleri fosforlanmış JAK'lara ve reseptörlerine bağlanarak yolağı kapatırlar. SOCS'lar negatif regülasyonlarını 3 farklı şekilde etkileyebilirler. İlk olarak, reseptör üzerindeki fosfotirozinlere bağlanarak, STAT gibi sinyal ileticilerin bu bölgelerde yoğunlaşmasını engellerler. İkinci olarak, doğrudan JAK'lara ya da reseptörlere bağlanarak özellikle JAK kinaz etkinliğini baskırlar. Üçüncü olarak, elongin BC kompleksi ve cullin 2 ile etkileşerek JAK'ların ve muhtemelen reseptörlerin ubikitinlenmesine ve böylece kararlılıklarının azalarak proteozomal yıkım için hedef haline gelmelerine neden olurlar (Rawlings, Rosler and Harrison 2004).

Üçüncü negatif regülatör sınıfı PIAS proteinleridir: PIAS1, PIAS3, PIASx ve PIASy. Bu proteinlerin merkezinde Zn(çinko)-bağlayan bir RING-finger bölgesi, N-terminalinde iyi korunmuş bir SAP (SAF-A/Acinus/PIAS) bölgesi ve hedef proteine bağlanmada etkili, daha az korunmuş bir karboksil bölgesi bulunmaktadır (Jackson 2001). PIAS proteinleri aktifleşen STAT dimerlerine bağlanarak, bu dimerlerin DNA'ya bağlanmasını engellerler (**Şekil 5**) (Shuai and Liu 2003).

Yakın dönemde, PIAS proteinlerinin E2 konjugaz Ubc9 ile etkileştiği ve RING-finger bölgesi tarafından düzenlenen SUMO etkinliği (SUMO - küçük Ubikutin bağlı düzenleyici proteinlerdir. Kovalent bağ ile hedef proteinlere bağlanarak ya da bağlı oldukları proteini serbest bırakarak bu proteinlerin etkinliğini düzenleyen proteinlerdir) için E3 konjugaz etkinliğini sağladığı gözlemlenmiştir (Jackson 2001). STAT'ların SUMO proteinleriyle etkileşebileceği gösterilmiş olsa da bu etkinin negatif regülasyondaki yeri hala bilinmemektedir (**Şekil 5**) (Rogers, Horvath and Matunis 2003).



Nature Reviews | Immunology

Şekil 5. Farklı PIAS proteinleri farklı mekanizmalarla JAK / STAT yolaklarını baskılayabilirler. **a)** PIAS1 ve PIAS3 Stat dimerlerinin DNA-bağlanma etkinliğini engelleyebilirler. **b)** PIASX ve PIASY, histon deasetilaz (HDAC) gibi diğer baskılayıcı proteinleri kullanarak STAT'ın bir transkripsiyonel baskılayıcısıymış gibi çalışıyor olabilirler. **c)** PIAS proteinleri SUMO' ların STAT'lara bağlanmalarını teşvik edebilirler. (Shuai and Liu 2003).

5. Gereç ve Yöntem

5.1. Kullanılan aletler

Otomatik mikropipetler, Gilson, (Fransa)
Isı Bloğu, Biosan, (Letonya)
Santrifüj, Eppendorf, (Almanya)
Spektrofotometre, Amersham Biosciences, (England)
Otoklav, Barnstead, (ABD)
Buz Bloğu, Eppendorf, (Almanya)
Buzdolabı, Arçelik, (Türkiye)
Derin Dondurucu, Beko, (Türkiye)
Biyolojik Güvenlik Kabini, Tezsan, (Türkiye)
Vortex, Biosan, (Letonya)
Lightcycler 2.0, Roche, (Almanya)

5.2. Kullanılan sarf malzemeleri

Pudrasız steril eldiven, Great Glove, (Malezya)
1.5 ml lik Ependorf Tüp, Axygen, (ABD)
0.2 lik Ependorf Tüp, Axygen, (ABD)
Kapiller, Roche, (Almanya)
Filtreli mikropipet uçlar (1000µl, 200 µl, 20 µl, 10 µl, 0.2 µl), Axygen, (ABD)

5.3. Kullanılan Reaktifler ve Hasta örnekleri

Hasta kan-kemik iliği örnekleri

JAK2 geni 14. Eksondaki 617. Kodon için tasarlanmış primer ve proplar, TIBMOLBIOL (McClure, Mai and Lasho 2006)

Primer 1 5'-AAGCAGCAAGTATGATGAG-3'

Primer 2 5'-CCTAGCTGTGATCCTGAAA-3'

Probe 1 5'-ATGTGTCTGTGGAGACGAGAG-3'- **FITC**

Probe 2 **LC RED 640** -5'-
AAGTAAACTACAGGCTTTCTAATGCCTTTCT-3'

BSA (Bovin Serum Albumin), Invitrogen, (ABD)

Highpure PCR template preparation kit, Roche, (Almanya) (Cat. No. 11 796 828 001)

- Binding Buffer-Guanidiyum Hidroklorid
- İnhibitor Removal Buffer- Guanidiyum Hidroklorid
- Wash Buffer
- Elution Buffer

İzopropanol, Merck, (Almanya)

Distile Su, Eczacıbaşı, (Türkiye)

Hibridizasyon Mix, Lightcycler DNA Master Hybprobe, Roche, (Almanya)

Magnezyum Klorür (MgCl₂), Lightcycler DNA Master Hybprobe, Roche, (Almanya)

5.4. Hasta örneklerinden DNA izolasyonu

Bu çalışmada Acıbadem Genetik Tanı Merkezi'ne 2006-2009 yılları arasında ilgili lokasyonlardan JAK2V617F mutasyon analizi için gönderilen 725 hastanın perifer kan ve/veya kemik iliği örnekleri kullanılmıştır.

Örnekler, pastör pipet ile EDTA'lı tüp içerisinden alınarak daha önceden etiketlenmiş ependorf tüplerine sırayla aktarıldı. İzolasyona başlamadan önce ısıtıcı 70°C ye ayarlandı; yeterli miktarda "Elution Buffer" ependorf tüpüne aktarılıp ısınmaya bırakıldı. 1.5 ml'lik ependorf tüpüne daha önce etiketlenmiş tüplere aktarılan örneklerden 200µl (*) aktarıldı. Üzerine 40 µl Proteinaz K ve 200 µl "Binding Buffer" eklendi. Vorteksle karıştırılarak 70 °C de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Isıtıcıdan alınan ependorf tüpünün içerisine 100 µl izopropanol eklenerek karıştırıldı. Bir toplama tüpünün üzerine high filter tüp eklendi. İzopropanolla karıştırılan örnek, filtrenin üst kısmına pipetlendi. Santrifüj sonrasında toplama tüpünde kalan sıvı atıldı. Santrifüjden alınan filtre temiz başka bir toplama tüpüne aktarıldı. 500 µl "Inhibitör Removal Buffer" eklendi. Toplama tüpü-filtre santrifüje aktarılıp 8000g'de 1 dakika çevrildi. Santrifüj sonrasında toplama tüpünde kalan sıvı atıldı. Santrifüjden alınan filtre temiz başka bir toplama tüpüne aktarıldı. 500 µl "Washing Buffer" eklenerek toplama tüpü-filtre santrifüje aktarılıp 8000g de 1 dakika çevrildi. Santrifüj sonrasında toplama tüpünde kalan sıvı atıldı. Santrifüjden alınan filtre temiz başka bir toplama tüpüne aktarıldı. Yeniden 500 µl "Washing Buffer" eklendi. Toplama tüpü-filtre santrifüje aktarılıp 8000g de 1 dakika çevrildi. Santrifüj sonrasında toplama tüpünde kalan sıvı atıldı. Santrifüjden alınan filtre temiz başka bir toplama tüpüne aktarıldı. Herhangi bir solüsyon eklenmeden kurutma amaçlı toplama tüpü-filtre santrifüje aktarılıp maksimum hızda 10 saniye çevrildi.

Santrifüj sonrasında toplama tüpünde kalan sıvı atıldı. Santrifüjden alınan filtre temiz başka bir toplama tüpüne aktarıldı. Daha önceden sıcaklığı 70°C'ye getirilmiş "Elution Buffer"dan 200µl eklendi. Toplama tüpü-filtre santrifüje aktarılıp 8000g de 1 dakika çevrildi. Santrifüj sonrasında toplama tüpünde kalan sıvı daha önceden etiketlenmiş bir ependorf tüpüne aktarılıp +4°C de saklandı.

(*) Örnek tipi kemik iliği olduğunda örneğin akışkanlığına göre ependorf tüpüne aktarılacak örnek miktarı değişebilir. Yüksek Hct değerine sahip örneklerde DNA izolasyonu sırasında sorun olabilmektedir. Örnek 1X PBS çözeltisi ile 1: 3 oranına kadar seyreltilir.

5.5. Gerçek zamanlı (Real Time) PCR

5.5.1. PCR master karışımının hazırlanması

İçerik	Hacim
Distile Su (PCR düzeyinde)	10 μ l
Hibridizasyon Karışımı	2 μ l
MgCl ₂	2 μ l
Primer 1	0,1 μ l
Primer 2	0,1 μ l
Prob 1	0,4 μ l
Prob 2	0,4 μ l
Toplam Hacim	

Reaksiyon başına,

15 μ l master karışım + 5 μ l hasta DNA (~200 ng) örneği = 20 μ l son hacim

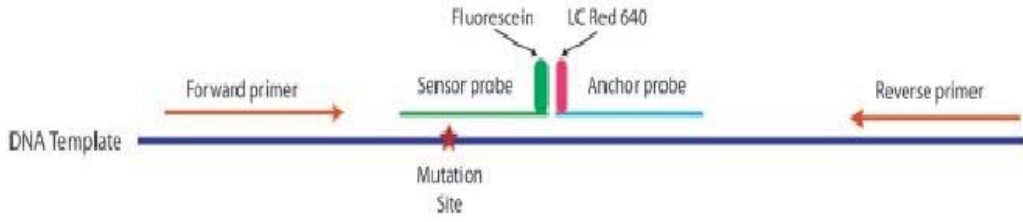
5.5.2. Reaksiyona etki eden faktörlerin ortadan kaldırılması

Hastalardan perifer kan yerine kemik iliği geldiği durumlar da sözkonusu olmuştur. Bu hastalarla yapılan çalışmalarda herhangi bir sonuç alınamamakla beraber PCR reaksiyonunun inhibisyonunun kemik iliği örneklerinin taşındığı tüpler içerisindeki heparinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu problemin önüne hazırlanan master karışım içerisine reaksiyon başına 0.08 μ l 10x BSA eklenerek geçilmiştir (Vu, Litvinov and Willson 2008).

5.5.3. Hibridizasyon Prob Yöntemi

- PZR reaksiyonunda farklı 2 oligonükleotid DNA'nın ilgili yerinde birinin başı diğerinin kuyruğuna gelecek şekilde hibridize olur (~1-2 nükleotid ara).

- F1 donör florofoz bir dış kaynağlı ışık kaynağı yoluyla yükseltgenir ve bu yükseltgenme enerjisini dipol-dipol etkileşimiyle F2 (Light cycler-Red 640 ya da 705) (FRET) alıcısına iletir.
- Yükseltgenen F2 florofozu ölçülebilir dalgaboyunda ışık yayır.

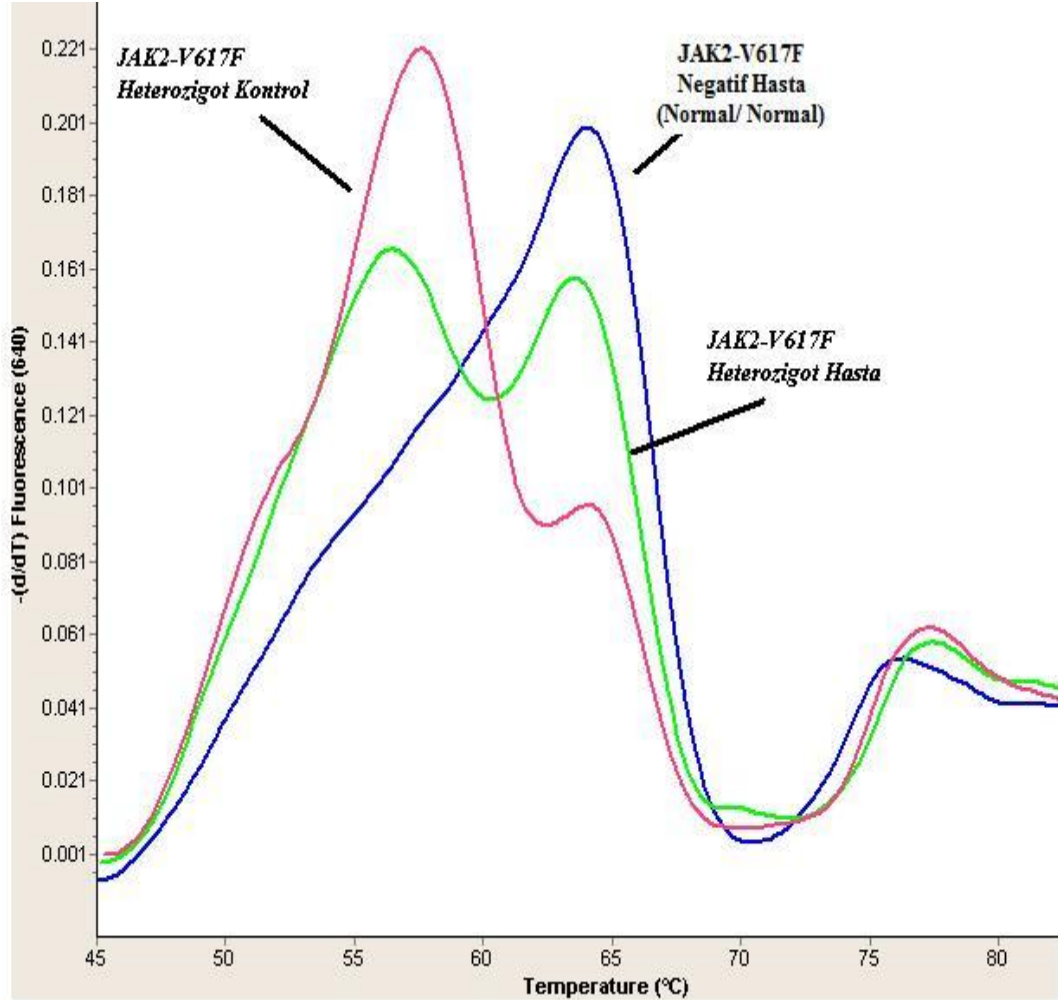


şekil 6. Hibridizasyon Prob Yöntemi (Steensma 2006).

Kullanılan mutasyon saptayan prob (A), referans dizinin mutasyonsuz (Yabarıll ya da Normal) haline göre tasarlanmıştır (**şekil 6**) (Steensma 2006). Buna göre mutant hastalar Erime Eğrisi Analizi sırasında sıcaklık artarken mutasyona bağlı olarak bağlandıkları diziden daha kolay ayrılacak ve normal (V617F Negatif) olan hastalara göre daha düşük sıcaklıkta eğri vereceklerdir. Normal hastalar ve homozigot hastalar farklı sıcaklıklarda tek bir eğri veriyorken, heterozigot hastalar hem normal eğrisi hem mutant eğrisi vereceklerdir.

Erime sıcaklığı karşılaştırması (°C)

NORMAL HASTA \geq HETEROZİGOT HASTA \geq HOMOZİGOT HASTA (Şekil 7)



Şekil 7. Hastaların Karşılaştırılması. Kullanılan prob referans dizinin mutasyonsuz (Yabanıl ya da Normal) haline göre tasarlanmıştır. Çalışılan hastalar JAK2V617F mutasyonuna göre Normal (Normal / Normal), Heterozigot (V617F / Normal) ve Homozigot (V617F / V617F) olarak sınıflandırılır. Erime eğrisi analizinde V617F mutasyonu açısından normal olan hastalarda grafikte 63°C civarında tek bir eğri gözlenmektedir. V617F mutasyonu açısından heterozigot olan hastalarda grafikte biri 57°C diğeri 63°C de olmak üzere iki farklı eğri beklenmektedir. V617F mutasyonu açısından homozigot olan hastalarda grafikte 57°C de tek bir eğri gözlenmektedir (Acıbadem Genetik Tanı Merkezi 2006).

5.5.4. PCR programı

Program 1: Denatürasyon

Döngü Program Data	Değer
Döngüler	1
Analiz Modu	Yok
Hedef Sıcaklıklar	Segment 1
Hedef Sıcaklık (°C)	95
İnkübasyon zamanı	00:00:16
Sıcaklık Değişim Oranı (°C/s)	20
İkinci hedef sıcaklık (°C)	0
Basamak Ölçüsü (°C)	0
Basamak Geciktirme (döngüler)	0
Kazanım Modu	Yok

Program 2: Amplifikasyon

Döngü Program Data	Değer		
Döngüler	45		
Analiz Modu	Kantifikasyon		
Hedef Sıcaklıklar	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Hedef Sıcaklık (°C)	95	50	72
İnkübasyon zamanı	00:00:10	00:00:30	00:00:10
Sıcaklık Değişim Oranı (°C/s)	20	20	20
İkinci hedef sıcaklık (°C)	0	0	0
Basamak Ölçüsü (°C)	0	0	0
Basamak Geciktirme (döngüler)	0	0	0
Kazanım Modu	Yok	Tek	Yok

Program 3: Melting Curve Analizi

Döngü Program Data		Değer		
Döngüler	1			
Analiz Modu	Melting curve'ler			
Hedef Sıcaklıklar	Segment 1	Segment 2	Segment 3	
Hedef Sıcaklık (°C)	95	45	85	
İnkübasyon zamanı	00:00:00	00:02:00	00:00:00	
Sıcaklık Değişim Oranı (°C/s)	20	20	0,25	
İkinci hedef sıcaklık (°C)	0	0	0	
Basamak Ölçüsü (°C)	0	0	0	
Basamak Geciktirme (döngüler)	0	0	0	
Kazanım Modu	Yok	Yok	Kesintisi z	

Program 4: Soğutma

Döngü Program Data		Değer
Döngüler	1	
Analiz Modu	None	
Hedef Sıcaklıklar	Segment 1	
Hedef Sıcaklık (°C)	40	
İnkübasyon zamanı	00:00:30	
Sıcaklık Değişim Oranı (°C/s)	20	
İkinci hedef sıcaklık (°C)	0	
Basamak Ölçüsü (°C)	0	
Basamak Geciktirme (döngüler)	0	
Kazanım Modu	Yok	

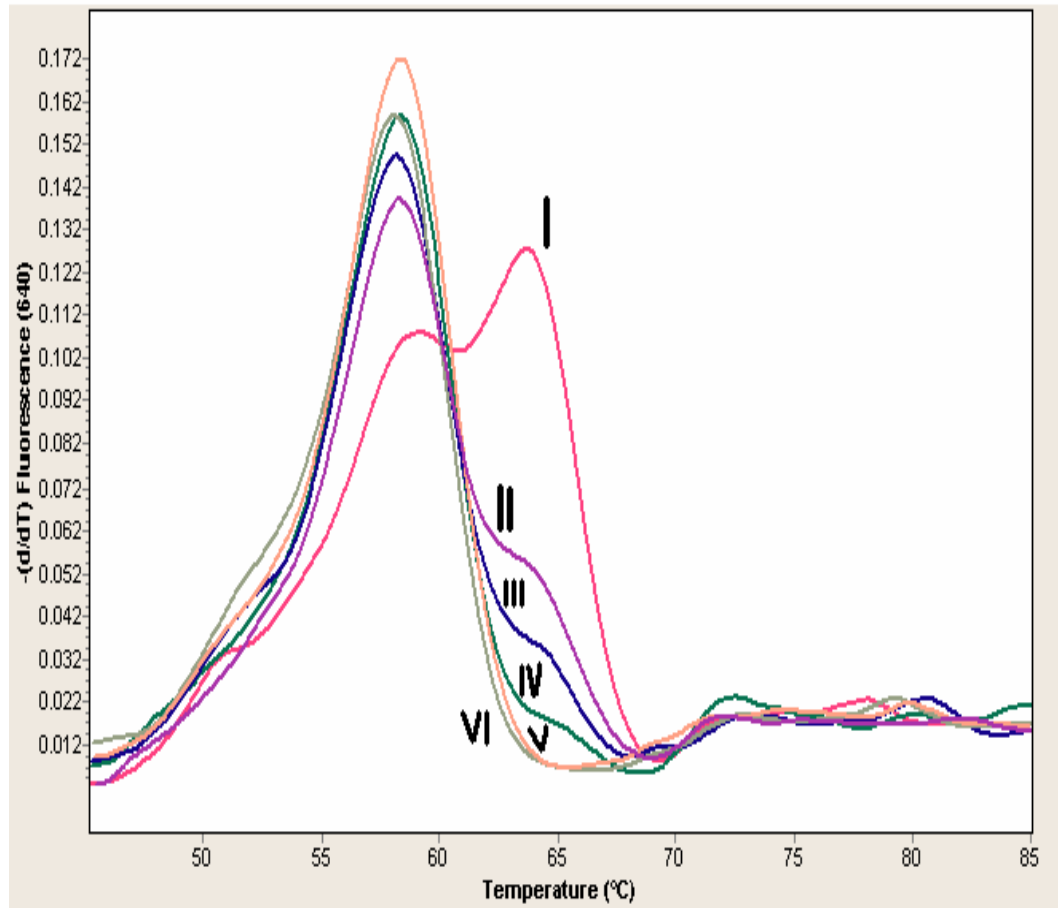
5.6. Testin Duyarlılığı

Homozigot (V617F / V617F) hücre serilerinden alınan DNA, % 20, 5, 3, 2, 1 ve 0.5'lik konsantrasyonlarda yabancı tip (Normal / Normal) DNA içerisinde çözüldü. Homozigot Mutant hücre serilerinden ve yabancı tip hücre serilerinden DNA izolasyonu yapıldı. İzolasyon sonrası her iki örneğin konsantrasyonları farklı

miktarlarda su içerisinde çözülerek eşitlendi. Aynı konsantrasyona ait bu iki örnek farklı dilüsyonlarda hazırlandı.

Tablo 10. Test duyarlılığı için hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki örnekler.

	V617F / V617F(μl)	Normal / Normal (μl)	Toplam (μl)	% V617F / Normal
I	20	80	100	20
II	5	95	100	5
III	3	97	100	3
IV	2	98	100	2
V	1	99	100	1
VI	0.5	99.5	100	0.5



Şekil 8. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış örneklerin melting curve analiz sonuçları (Acıbadem Genetik Tanı Merkezi 2006).

I- % 20 JAK2V617F II- %5 JAK2V617F III- %3 JAK2V617F
IV- %2 JAK2V617F V- %1 JAK2V617F VI- %0.5 JAK2V617F

Bu farklı dilüsyonlarla yapılan duyarlılık çalışmasında farklı erime sıcaklarında gözlemlenen mutant ve yabanıl tip eğrilerinin durumu incelendi. Yabanıl tip eğrisinin %20'lik konsantrasyonda çok belirgin olduğu, konsantrasyon azaldıkça yüksekliğinin azaldığı ve %2'lik konsantrasyondan sonra tamamen kaybolduğu gözlemlendi. Testin duyarlılık alt sınırı %2 olarak belirlendi (**Şekil 8**).

6. BULGULAR

Yapılan çalışmalarda 169 PV tanılı hastanın 55'inde JAK2V617F mutasyonu saptanmıştır. Bu mutasyon hastalarda, heterozigot veya homozigot olarak ayrılmamıştır. Yine esansiyel trombositoz tanılı 108 hastanın 34'ünde, idiopatik miyelofibroz tanılı 8 hastanın 1'inde mutasyon saptanmıştır (**Tablo 11**). Özgül bir endikasyonu olmayıp sadece kronik miyeloproliferatif hastalık şüphesiyle gelen 725 hastanın 210'unda JAK2V617F mutasyonu saptanmıştır. Homozigosite değerlendirildiğinde, PV şüphesiyle gelen 65 hastanın 2'sinde (%3), ET şüphesiyle gelen 42 hastanın 1'inde (%2), herhangi bir KMPH şüphesiyle gelen 725 hastanın 13'ünde (%1) homozigot genotip (V617F / V617F) saptanmıştır.

Tablo 11. KMPH'da hasta sayısına göre JAK2V617F mutasyon varlığı bulguları

JAK2V617F mutasyonu varlığı	Mutant Hasta / Toplam Hasta	%
Polisitemia Vera Tanılı	55 / 169	32
Esansiyel Trombositoz Tanılı	34 / 108	31
İdiopatik Miyelofibroz Tanılı	1 / 8	12
KMPH Şüphesi	210 / 725	29

KML şüphesiyle gelen 173 hastada JAK2V617F mutasyon varlığı sorgulanmıştır. Buna göre 95 hastada hem JAK2V617F hem BCR/ABL negatif bulunurken, 21 hastada sadece BCR/ABL pozitif, 50 hastada sadece JAK2V617F pozitif, 7 hastada da hem JAK2V617F hem BCR/ABL pozitif bulunmuştur (**Tablo 12**).

Tablo 12. JAK2V617F ve BCR/ABL varlığı sorgulanan hasta bulguları

(JAK2V617F , BCR/ABL)	Hasta Sayısı / Toplam Hasta	%
(- , -)	95 / 173	55
(- , +)	21 / 173	12
(+ , -)	50 / 173	29
(+ , +)	7 / 173	0.3

Hastaların V617F mutasyon varlığı yıllara göre değerlendirilmiştir. 2006 yılında gelen 122 hastanın 34'ünde (%28) V617F mutasyonu görülmüştür. 2007

yılında gelen 145 hastanın 48'inde (%33) mutasyon görülmüştür. 2008 yılında gelen 297 hastanın 82'sinde (%27) JAK2V617F mutasyonu saptanmıştır. Yine 2009 yılında gelen 161 hastanın 46'sında (%28) mutasyon saptanmıştır (**Tablo 13**).

Tablo 13.Yıllara göre JAK2V617F mutasyonunun hasta sayısına göre dağılımı

	2006	2007	2008	2009	Toplam
Mutant Tip (F617)	34	48	82	46	210
Toplam Hasta	122	145	297	161	725
% Mutant (V617F)	28	33	27	28	28

7. TARTIŞMA

Çalışmamızda PV tanısıyla gelen 169 hastanın 55'inde (%32) JAK2V617F mutasyonu saptandı (**Tablo 14**). Daha önceki çalışmalarda bu oran % 65-97 arasında değişmektedir (Baxter et al 2005, James et al 2005, Jones et al 2005, Kralovics et al 2005, Levine et al 2005, Zhao et al 2005, Hsu et al 2006). Farklı çalışmalarda benzer sonuçların görülmesini, bu çalışmalarda kullanılan hasta örneklerinin kalitesi, testlerin hassasiyeti ama özellikle kullanılan hastaların kliniklerinin daha iyi karakterize edilmiş olması açıklayabilir.

KMPH şüphesiyle gelen ve JAK2V617F mutasyonu saptanan hastaların sayısı 210 dur. Bu hastaların, PV tanılı hastalar olduğu düşünülürse PV tanılı hasta sayısı 379 (169 + **210**), JAK2V617F-pozitif olan PV hasta sayısı 265 (55 + **210**) olacaktır. 379 hastanın 265'inde bu mutasyonun bulunduğunu öngörülürse bu oran 265 / 379 (%70) olacaktır. Bu varsayım literatürdeki değerlerle daha çok benzerlik göstermektedir.

Tablo 14. Hasta JAK2V617F sonuçları ve Literatür Karşılaştırması

JAK2V617F mutasyonu	Mutant Alel / Hasta Sayısı	(%)	Literatür (%)
Polisitemia Vera	55 / 169	32	~95
Esansiyel Trombositoz	34 / 108	31	~50
İdiyopatik Miyelofibroz	1 / 8	12	~50
KMPH Şüphesi	210 / 725	29	

PV'da, yeniden gözden geçirilen DSÖ sınıflandırmasına göre JAK2V617F mutasyonu temel kriter olarak kabul edilmiştir (Tefferi et al 2007). Buna rağmen, JAK2V617F mutasyonu olmayan PV hastalarında (\geq % 5) JAK2 ekson 12 mutasyonları bulunmuştur (Scott et al 2007). DSÖ'ye göre JAK2V617F mutasyonu olmayan PV hastalarında ekson 12 mutasyonları %15.9 civarındadır. Farklı PCR teknikleriyle daha iyi karakterize edilmiş çalışmalarda bu oran %83'e kadar çıkabilmektedir (Scott et al 2005, Pardanani et al 2007, Scott et al 2007, Williams et

al 2007, Pietra et al 2008). En sık karşılaşılan mutasyonlar N542-E543del, H538QK539L ve F537-K539delinsL alt gruplarıdır. 543. kodondaki glutamik asit değişimi (N542-E543del7 ve K539L) ekson 12 mutasyonu taşıyan vakalarda daha önce tanımlanmışlardır (Butcher et al 2007, Pietra et al 2008). Bu mutasyonlar V617F mutasyonuna göre daha çok kadınlarda ve daha erken yaşta görülmektedir (Scott et al 2007). Çalışmaya alınan hastaların sosyoekonomik konum, cinsiyet, yaş gibi kriterleri dikkate alınmamış olup, bu olguların sonuçlarımıza etkisi bilinmemektedir. PV hastalarında JAK2 ekson 12 mutasyon dağılımı %3-4 civarındadır (Butcher et al 2007, Pardanani et al 2007, Scott et al 2007, Pietra et al 2008). Bu durum sonuçlarımızdaki farkı açıklamak için yeterli görünmemektedir.

ET tanısıyla gelen 108 hastanın 34'ünde (%31) JAK2V617F mutasyonu saptandı (**Tablo 14**). Daha önceki çalışmalarda bu oran %23-57 arasında farklılık göstermektedir (Rawlings et al 2004, Baxter et al 2005, James et al 2005, Levine et al 2005, Zhao et al 2005). PV hastalarındaki literatürle farklılığın benzeri bir durum ET hastalarında da görülmektedir. PV'dan farklı olarak ET'de, JAK2V617F mutasyonu hastalıkla doğrudan ilişkilendirilmemiştir. ET hastalarında JAK2V617F mutasyon varlığının ~ %57 (Baxter et al 2005) olması bu durumu desteklemektedir. ET vakalarında, hekimin benzer kliniği olan birçok hastalık olasılığını indirgemektense, ET tanısını güçlendirmek için bu mutasyon varlığını sorgulamak istediği düşünülebilir. Endikasyon kriterlerinin farklılığı tanıda önümüze çıkmaktadır. Birçok hekim, kendi endikasyon kriterlerine göre hastaya yaklaşmakta, evrensel kriterleri göz ardı etmektedir. Bu durum, ET hastalarında JAK2V617F mutasyon oranının literatürle farkını açıklayabilir. Zaten, JAK2V617F mutasyonunun ET hastalarının risk sınıflandırmasındaki yeri hala tartışmalıdır. Bazı çalışmalarda, JAK2V617F trombozla ilişkilendirilirken (Campbell et al 2005, Cheung et al 2005), bu sonuç sonraki çalışmalarda desteklenememiştir (Antonioli et al 2005, Wolanskyj et al 2005).

Bir çalışmada, V617F mutasyonu taşıyan ET hastalarının, taşımayanlara göre, PV hastalarına benzer özellikleri olduğu gösterilmiştir. Bu özellikler artan hemoglobin, nötrofil sayısı; kemik iliği eritropoezi ve granülopoezi; tromboz sıklığı ve PV'ya dönüşümde artış olarak sıralanmıştır (Campbell et al 2005). V617F mutasyonu olan ET hastalarında, Epo ve ferritin değerleride V617F-Negatif ET

hastalarına göre düşüktür (Campbell et al 2005). Bunun yanında, V617F-negatif ET hastaları MPH özelliği olan sitogenetik anomaliler, anormal megakaryosit morfolojisi olan çok hücreli kemik iliği, PRV(Polisitemia Rubra Vera)'nin artan ekspresyonu, Epo-bağımsız eritroid koloni büyümesi ve miyelofibrotik ya da lösemik dönüşüm riski gibi birçok klinik ve laboratuvar bulgularına sahiptir (Campbell et al 2005). Bu bulgu, JAK2V617F'si olan ET ve PV gibi hastaların birbirine biyolojik olarak bağlı, eritrositoz derecesine göre sınıflandırılan ve fizyolojik ve genetik değişkenlerle değişiklik gösterebildiğinin bir kanıtı olmaktadır (Campbell et al 2005).

Çalışmaya alınan hastalar homozigosite varlığına göre sınıflandırıldığında, PV şüphesiyle gelen 65 hastanın 2'sinde (%3), ET şüphesiyle gelen 42 hastanın 1'inde (%2), herhangi bir KMPH şüphesiyle gelen 725 hastanın 13'ünde (%1) homozigot genotip (V617F / V617F) saptanmıştır. Homozigot V617F mutasyonu kazanımı, polisitemik fenotipe yol açmakta, homozigot mutant genotip PV hastalarının %30'unda görülürken, ET'de ise daha nadir görülmektedir (Baxter et al 2005, James et al 2005, Kralovics et al 2005, Levine et al 2005). ET hastalarıyla karşılaştırıldığında, PV hastalarında hastalığın tanı konma sürecinin daha uzun olması, homozigositenin oluşabilmesi için yeterli zamanı sağlıyor olabilir. Yine PV hastalarında JAK2 lokusunun mitotik rekombinasyonunun sıklığı homozigositeyle sonuçlanıyor olabilir.

PV hastalarında, literatürle çalışmamız arasında önemli bir fark göze çarpmaktadır. Farklı çalışmalarda kullanılan farklı hassasiyete sahip metodlar bu farklılığın sebebi olabilir. Sonuçta, JAK2V617F mutasyonu bir kromozomal anomali olmadığı için bu değişikliğin hassasiyeti çok yüksek olan FISH yöntemi ile saptanması mümkün değildir (Levine et al 2005). V617F bölgesini içeren eksonda yapılan dizi analizi, PV, ET ve MMM hastalarında ve son zamanlarda diğer bütün KMPH'da bu mutasyon tayinine olanak sağlamıştır (Jones et al 2005, Steensma et al 2005). Tefferi, homozigot PV hastalarında, daha yüksek hemoglobin seviyesine ve artan kaşıntı ve fibrotik komplikasyon eğilimi olduğunu göstermiştir (Tefferi et al 2005).

Miyelofibroz tanısıyla çalışmaya alınan 8 hastanın 1'inde (%12) JAK2V617F mutasyonu saptandı (**Tablo 14**). Daha önceki çalışmalarda bu oran

%33-57 arasında değişiklik göstermektedir (Baxter et al 2005, Kralovics et al 2005, Hsu et al 2006). Hasta sayısının yeterli olmaması karşılaştırma yapmaya olanak vermemektedir.

Raporlanan sonuçlar arasındaki farklılığın temelinde 3 ana neden bulunmaktadır: 1. Miyeloproliferatif hastalık tanısında kullanılan kriterlerin sınırlılığı, 2. Mutasyonu saptamak için kullanılan yöntemin hassasiyeti, 3. DNA kaynağı. Birçok çalışmada dizi analizi teknikleri kullanılmaktadır. Halbuki, bu teknikler alele-özgü PCR ya da ARMS PCR gibi çoğaltma kaynaklı olan tekniklere göre daha az hassasiyete sahiptir (Campbell et al 2006). Çalışmaların birçoğunda perifer kan nötrofilleri kullanılmakta, bu nötrofillerin aynı klonal öncüden ortaya çıktığı ve PV'ya değiştığı düşünölmektedir. JAK2V617F mutasyonu, hemetopoetik kök hücreler, miyeloid öncüler ve megakaryositeritroid öncü fenotiplerle birlikte nötrofil ve trombosit gibi olgun hücrelerle koloni oluşturan hücrelerde de görölmektedir (Jamieson et al 2006, Kiladjian et al 2006).

Birçok miyelofibroz hastasında JAK2V617F mutasyonu tarayan Tefferi, mutasyonun daha çok, daha önce PV hikayesi olan hastalarda olduğunu göstermiştir (Tefferi et al 2005).

Her ne kadar, hastalarımız arasında homozigot JAK2V617F mutasyonu olan hasta bulunmuyor olsa da Kravolics, homozigot mutant olan hastaların heterozigot olanlara göre daha farklı bir kliniğı olduğunu, hastalığın homozigot olanlarda daha uzun süreyle seyrettiğini ve sekonder miyelofibroz oluşumunun hızlandığını göstermiştir (Kralovics et al 2005).

JAK2V617F mutasyonunun bulunması PV, ET ve MMM hastalıklarının patogenezi anlamaya yardımcı olurken, JAK2V617F-Negatif ET ve MMM hastalıklarının etiyojisi hala bilinmemektedir. JAK2V617F-Negatif ET ve MMM hastalarında sıklıkla klonal granülopoez görölmekte, bu hastalarda JAK2 mutantının bulunamaması granülosit katılımı yokluğuna işaret etmemektedir (Zhao et al 2005, Levine et al 2006). Klonal hematopoezin görölmesi, hastalığa yol açan başka mutasyonların varlığını düşöndürmektedir (Kiladjian et al 2006, Kralovics et al 2006, Levine et al 2006). Bu olasılık yakın zamanda yapılan bir çalışmada 45 JAK2V617F-Negatif MMM hastasının 4'ünde MPL geninde mutasyon görölmesiyle

gün yüzüne çıkmıştır (Pikman et al 2006). 2006'da, JAK2V617F–Negatif MMM hastalarında, 2 yeni MPL somatik mutasyonu (MPL W515L(%5), MPL W515L(%1)) bulunmuştur. MPL W515L/K mutasyonu hematopoetik hücrelerde sitokin-bağımsız proliferasyon kapasitesine ve JAK / STAT sinyal iletiminin devamlı etkinliğine sebep olmaktadır (Pikman et al 2006). Çalışmadaki MMM hasta sayısının yetersiz olması karşılaştırma yapmayı güçleştirmektedir.

Hem JAK2V617F mutasyonu hem BCR/ABL transkripti taranan 173 hastanın 7'sinde (%4) hem bu nokta mutasyon hem transkript gözlenmiştir (**Tablo 15**). Elde ettiğimiz sonuç ilk bakışta literatürle farklılık gösterse de, bu hastaların kliniğinin atipik ya da klasik KML olarak ayrılmasıyla anlam kazanabilir. Her ne kadar bir MPH'tan bir diğerine -özellikle PV ya da ET'den sekonder miyelofibroza-transformasyon belli sıklıkla gerçekleşiyor olsa da (hastalığı takib eden 15-20 yıllık süreçte %10-20 oranında) Passamonti, Malabarba, Orlandi, Baratè, Canevari, Brusamolino, Bonfichi, Arcaini, Caberlon, Pascutto and Lazzarino 2003) (Cervantes, Alvarez-Larrán, Talam, Gómez and Montserrat 2002), JAK2V617F mutasyonu bulunmadan önce (Kemp, Stafford and Tanner 1964) (Koulischer, Fruhling and Henry 1967) (Hoppin and Lewis 1975) (Haq 1990) (Jantunen and Nousiainen 1991) (Roth, Oral, Przepiorka, Gollin and Chervenick 1993) (Ganti, Potti and Mehdi 2003) (Curtin, Campbell, Green 2005) (Wahlin and Golovleva 2003) (Mauro, Loriaux and Deininger 2004) (Cesar, Cabello, Ferro and Navarro 2006) (Araki, Takimoto, Fujimi, Murase, Araki, Takahira, Matsunaga, Terui, Kogawa, Hirayama, Kato and Niitsu 2007) (Bennett and Chubar 2007) ve bulunduktan sonra (Scott et al 2005) (Hussein, Bock, Seegers, Flasshove, Henneke, Buesche and Kreipe 2007)(Bornhäuser Mohr, Oelschlaegel, Bornhäuser, Jacki, Ehninger and Thiede 2007)(Krämer, Reiter, Kruth, Erben, Hochhaus, Müller, Cross, Jones, Ho and Hensel 2007)(Bocchia, Vannucchi, Gozzetti, Guglielmelli, Poli, Crupi, Defina, Bosi and Francesco 2007)(Mirza, Frantz, Clarke, Voth and Turner 2007)(Pardini, Fozza, Contini, Rimini, Ottaviani, Amabile, Rosti and Longinotti 2008)(Kim, Shin, Kim, Yang, Cho, Lee, Chung, Ryang and Kim 2008)(Jallades, Hayette, Tigaud, Johnston, Coiffier, Magaud and Ffrench 2008)(Conchon, Costa, Novaes, Dorlhiac-Llacer, de Alencar Fischer Chamone and Bendit 2008)(Cambier, Renneville, Cazaentre, Soenen, Cossement, Giraudier, Grardel, Lai, Rose and Preudhomme 2008) MPH'tan KML'ye ya da KML'den MPH'lara

transformasyon daha az sıklıkla rapor edilmiştir. 290 KML'li hasta ile toplu yapılan bir çalışmada sadece 1 hastada (%0.3) JAK2V617F mutasyonu pozitif bulunmuştur (Scott et al 2005)(Jelinek, Oki, Gharibyan, Bueso-Ramos, Prchal, Verstovsek, Beran, Estey, Kantarjian and Issa 2005). Birçok hastada, KML, MPH'tan sonra gelişmiştir (%67.9). Genel olarak, PV, MPH'lar içerisinde KML ile en çok rastlanan hastalık (%51.7) olurken, PV'yı primer miyelofibroz takip etmektedir.(%37.9) ET'nin KML'ye dönüşümü ile ilgili henüz herhangi bir yayın bulunmamaktadır. KML ve KMPH'ların risk faktörleri çok az bilinmektedir.Yaş ve radyasyona maruz kalma KML için risk faktörleri olarak bilinirken,yaş ve aile hikayesi MPH'lar için risk faktörleri olarak görülmektedir (Preston, Kusumi, Tomonaga, Izumi, Ron, Kuramoto, Kamada, Dohy, Matsuo and Matsui 1994)(Landgren, Goldin, Kristinsson, Helgadottir, Samuelsson and Björkholm 2008). Devamlı aktif hale geçen JAK2 sinyalizasyonunun kemik iliğindeki sitokin uyarımını arttırdığını, bu durumun miyeloid kök hücrelerde genetik değişikliğe ve BCR/ABL translokasyonuna sebep olduğu düşünülebilir. JAK2 sinyalizasyonu ve BCR/ABL arasındaki bir etkileşim olduğuna dair bulgular bulunmaktadır. BCR/ABL, JAK2 ile bir yapı oluşturmakta ve bu yapı sonraki tirozin fosforilasyonunu uyarmaktadır (Xie, Wang, Liu, Sun, Wilson, Smithgall and Arlinghaus 2001). Literatürdeki, MPH ve KML birlikteliğindeki artan sıklık bu iki hastalık arasında bir bağlantı olduğuna işaret etmektedir.

Tablo 15. JAK2V617F mutasyonunun BCR-ABL ile ilgili sonuçları ve literatür ile karşılaştırılması.

(JAK2V617F , BCR/ABL)	Hasta Sayısı	%	Literatür(%)
(- , -)	95	55	
(- , +)	21	12	
(+ , -)	50	29	
(+ , +)	7	4	0.3

Üzerinde durduğumuz temel kavram farklı endikasyon kriterlerinin kullanılıyor olması olunca, endikasyon kriterlerinde JAK2V617F mutasyonu keşfinin yapıldığı 2005'den günümüze herhangi bir gelişimin varlığını sorgulamanın gerekli olduğu düşünülmüştür. Mutasyonun ilk sorgulandığı 2006 yılından günümüze literatürle uyumun artmış olabileceği, toplam hasta içerisindeki farklılığın aslında ilk senelerdeki tecrübesizlik ve endikasyon kriterlerinin yetersizliğinden kaynaklanabileceği olasıydı. 2006 yılında JAK2V617F varlığı sorgulanan 122 hastanın 34'ünde (%27), 2007 yılında 145 hastanın 48'inde (%33), 2008 yılında 297 hastanın 82'sinde (%27), 2009 yılında şu ana kadar gelen 161 hastanın 46'sında (%28) toplamda 725 hastanın 210'unda (%28) mutasyon saptandı (**Tablo 16**). Oranlar 2006'dan günümüze sırasıyla % 27, 33, 27 ve 28 şeklinde gözlemlendi. Bütün hastalar içerisindeki oran %28 olarak saptandı (**Tablo 16**). Yıllar geçtikçe birbirine yakın olan oranları görülmesi endikasyon kriterlerinde önemli bir değişikliğin olmadığına işaret etmektedir.

Tablo 16. Yıllara göre JAK2V617F mutasyonu saptanan hasta oranları

	2006	2007	2008	2009	Toplam
Mutant Tip (F617)	34	48	82	46	210
Toplam Hasta	122	145	297	161	725
% Mutant(V617F)	27	33	27	28	28

Kronik miyeloproliferatif hastalıkla sonuçlanan olguların bu mutasyonlar dışında henüz keşfedilmemiş başka mutasyonlardan kaynaklandığı görüşü, literatürle olan farkı açıklamak için daha uygun görünmektedir. Zamanla yeni keşfedilen mutasyonların hastalıkların çehresini-endikasyonlara yaklaşımı, tedavi şekli- değiştirdiği açıktır. KMPH'da da özellikle JAK2 geninin kalan bölgesinde

hala tanımlanmamış mutasyonların varlığı bu farklılığı açıklamamıza yardımcı olabilecektir.

PV, ET ve MMM tedavisi için, JAK2V617F'nin bulunması umut verici olmuştur. Her ne kadar JAK kinaz inhibitörlerinin JAK2'ye karşı özgül etkinliği daha önce karakterize edilmiş olsa da (Meydan et al 1996), bu bileşikler klinik ve klinik öncesi uygulamada yeterli olamamışlardır. Yakın zamanda, yeterli potansiyelde bileşikler bulunmuş, bu bileşiklerin nanomolar aktivitesinin JAK2V617F kaynaklı büyüme ve sinyal iletimini durdurabildiği gösterilmiştir (Levine et al 2005).

JAK2V617F, JAK2 Ekson 12 mutasyonları ya da MPL W515L/K mutasyonlarını içermeyen MPH'ın genetik yapısı hala keşfedilememiş olup, JAK-STAT sinyal iletim yolağı bileşenlerinin analiziyle yeni mutant alellerin bulunabileceği kaçınılmaz görünmektedir.

Bu noktaya kadar pozitif hasta sayısının toplam hasta sayısı içerisindeki düşük oranı sebepleri sorgulandı. Farklılık düşük mutasyon oranından değil, yüksek sayıdaki negatif hasta sayısından da kaynaklanıyor olabilir. Hastaların benzer fenotipik özellikleri ve devamında yetersiz klinik endikasyonlar bize göre bu farklılığın en temel sebebini oluşturmaktadır. DSÖ yeni keşifler ile her geçen gün hastalıklara bakış açısını değiştirmekte, tanı ve tedavi kriterlerine yön vermektedir. Bu kriterlerin yeterince takip edilememesi hastalık teşhisinde yanılsamalara sebep olabilmektedir.

Kriterlerdeki farklılık benzer hikayesi olan hastalıkların birbiriyle karıştırılmasına sebep olabilmektedir. Hekim, JAK2V617F mutasyonu varlığıyla ilişkilendirilmiş PV gibi hastalıkları göz ardı etmek için hastada JAK2V617F mutasyonu olmadığını teyit etmeye çalışmaktadır. Bunu yaparak doğru tanı koyabilmek adına olası hastalık seçeneklerini indirgemektedir. JAK2V617F mutasyonu varlığını sorgulanırken, özellikle PV şüphesiyle yaklaşıldığı için hastalık endikasyonu PV olarak yazılmakta buna paralel olarak netleşmemiş kriterler ile çalışmaya alınan hasta, yüksek oranda negatif çıkmaktadır. JAK2V617F-Negatif PV endikasyonlu hasta sayısının artması doğal olarak

JAK2V617F-Pozitif PV hastalarının toplam hasta sayısı içerisindeki oranını düşürmektedir.

JAK2V617F mutasyonu sorgulayan hekimlerin aynı hekimler olmadığını da düşünürsek klinik ile laboratuvar arasındaki iletişim eksikliğinin çok ileri noktalarda olduğunu söyleyebiliriz.

Bu çalışmaya alınan hastalar, iki kurumun işbirliği ile sonuçlandırılmış olup, dahil edilen hastaların bu kurumlara başvuran hastalar olduğu göz önünde bulundurulduğunda; elde edilen istatistiksel sonuçların, Türk popülasyonunun geneline uyarlanması doğru değildir.

Daha doğru sonuçlar elde etmek için cinsiyet, yaş, hastalık endikasyon bilgileri gibi özellikleri de dikkate alarak, çok merkezli, toplu yapılacak bir çalışma ülkedeki JAK2V617F mutasyon varlığının dağılımını ifade etmek adına daha uygun bir çözüm olacaktır.

8. KAYNAKLAR

- Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S, Prchal JF, Steinmann L. (1976). Polycythemia vera: Stem-cell and probable clonal origin of the disease. *N Engl J Med*, 295(17):913-916.
- Afar DE, McLaughlin J, Sherr CJ, Witte ON, Roussel MF. (1995). Signalling by ABL oncogene through cyclin D. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(21):9540-9544.
- Alexander, WS. (2002). Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 2(6):410-416.
- Ang SO, Chen H, Hirota K, Gordeuk VR, Jelinek J, Guan Y, Liu E, Sergueeva AI, Miasnikova GY, Mole D, Maxwell PH, Stockton DW, Semenza GL, Prchal JT. (2002). Disruption of oxygen homeostasis underlies congenital Chuvash polycythemia. *Nat Genet*, 32(4):614-621.
- Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bogani C, Verrucci M, Ponziani V, Longo G, Bosi A, Vannucchi AM. (2005). Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia. *Leukemia*, 19(10):1847-1849.
- Araki N, Takimoto R, Fujimi A, Murase K, Araki H, Takahira N, Matsunaga T, Terui T, Kogawa K, Hirayama Y, Kato J, Niitsu Y. (2007). Reappearance of t(12;17)-positive primary myelofibrosis following ph+ CML cell reduction by imatinib. *Rinsho Ketsueki*, 48:518-23.
- Arcasoy MO, Harris KW, Forget BG. (1999). A human erythropoietin receptor gene mutant causing familial erythrocytosis is associated with deregulation of the rates of Jak2 and Stat5 inactivation. *Exp Hematol*, 27(1):63-74.
- Arnould C, Philippe C, Bourdon V, Gregoire MJ, Berger R, Jonveaux P. (1999). The signal transducer and activator of transcription Stat5b gene is a new partner of retinoic acid receptor alpha in acute promyelocytic-like leukaemia. *Hum Mol Genet* 8(9):1741-1749.
- Asao H, Okuyama C, Kumaki S, Ishii N, Tsuchiya S, Foster D, Sugamura K. (2001). Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. *J Immunol*, 167(1):1-5.
- Azam M, Erdjument-Bromage H, Kreider BL, Xia M, Quelle F, Basu R, Saris C, Tempst P, Ihle JN, Schindler C. (1995). Interleukin-3 signals through multiple isoforms of Stat5. *EMBO J*, 14(7):1402-1411.

- Baek JY, Li CY, Pardanani A, Butterfield JH, Tefferi A. (2002). Bone marrow angiogenesis in systemic mast cell disease. *J Hematother Stem Cell Res*, 11(1):139-146.
- Barahmand-Pour F, Meinke A, Groner B, Decker T. (1998). Jak2-Stat5 interactions analyzed in yeast. *J Biol Chem*, 273(20):12567–12575.
- Barr RD, Fialkow PJ. (1973). Clonal origin of chronic myelocytic leukemia. *N Engl J Med*, 289(6):307-309.
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR; Cancer Genome Project. (2005). Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative diseases. *Lancet*, 365(9464):1054–61.
- Becker S, Groner B, Müller, CW. (1998). Three-dimensional structure of the Stat3b homodimer bound to DNA. *Nature*, 394(6689):145–151.
- Bedi A, Zehnbauser BA, Barber JP, Sharkis SJ, Jones RJ. (1994). Inhibition of apoptosis by BCR - ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 83(8):2038–2044.
- Begitt A, Meyer T, van Rossum M, Vinkemeier U. (2000). Nucleocytoplasmic translocation of Stat1 is regulated by a leucine-rich export signal in the coiled-coil domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(19):10418–10423.
- Bellanné-Chantelot C, Chaumarel I, Labopin M, Bellanger F, Barbu V, De Toma C, Delhommeau F, Casadevall N, Vainchenker W, Thomas G, Najman A. (2006). Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. *Blood*, 108(1):346-352.
- Benekli M, Baer MR, Baumann H, Wetzler M. (2003). Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood*, 101(8):2940-2954.
- Bennett M, Chubar E.(2007).Chronic myeloid leukemia evolving after idiopathic myelofibrosis. *Isr Med Assoc J*, 9:562-3.
- Berk PD, Wasserman LR, Fruchtman SM, Goldberg JD. Treatment of polycythemia vera: A summary of clinical trials conducted by the Polycythemia Vera Study Group. In:

- Wasserman LR, Berk PD, Berlin NI. (Eds), (1995). Polycythemia Vera and the Myeloproliferative Disorders. Philadelphia, Pa: WB Saunders Co, p.166-194.
- Bocchia M, Vannucchi AM, Gozzetti A, Guglielmelli P, Poli G, Crupi R, Defina M, Bosi A, Francesco L.(2007).Insights into JAK2-V617F mutation in CML. *Lancet Oncol*, 8:864-6.
- Bornhäuser Mohr B, Oelschlaegel U, M, Bornhäuser P, Jacki S, Ehninger G, Thiede C.(2007).Concurrent JAK2(V617F) mutation and BCR-ABL translocation within committed myeloid progenitors in myelofibrosis. *Leukemia*, 21:1824-6.
- Bruneval P, Sassy C, Mayeux P, Belair MF, Casadevall N, Roux FX, Varet B, Lacombe C. (1993). Erythropoietin synthesis by tumor cells in a case of meningioma associated with erythrocytosis. *Blood*, 81(6):1593-1597.
- Buesche G, Georgii A, Duensing A, Schmeil A, Schlue J, Kreipe HH. (2003). Evaluating the volume ratio of bone marrow affected by fibrosis: A parameter crucial for the prognostic significance of marrow fibrosis in chronic myeloid leukemia. *Hum Pathol*, 34(4):391-401.
- Buss DH, Cashell AW, O'Connor ML, Richards F II, Case LD. (1994). Occurrence, etiology, and clinical significance of extreme thrombocytosis: A study of 280 cases. *Am J Med*, 96(3):247-253.
- Butcher CM, Hahn U, To LB, Gecz J, Wilkins EJ, Scott HS, Bardy PG, D'Andrea RJ. (2007). Two novel JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythaemia vera patients. *Leukemia*, 22(4): 870-3.
- Callus BA, Mathey-Prevot B. (2000). Hydrophobic residues Phe751 and Leu753 are essential for STAT5 transcriptional activity. *J Biol Chem*, 275(22):16954–16962.
- Cambier N, Renneville A, Cazaentre T, Soenen V, Cossement C, Giraudier S, Grardel N, Lai JL, Rose C, Preudhomme C.(2008).JAK2V617F-positive polycythemia vera and Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia: one patient with two distinct myeloproliferative disorders. *Leukemia*, 22:1454-5.
- Campbell PJ, Scott LM, Baxter EJ, Bench AJ, Green AR, Erber WN. (2006). Methods for the detection of the JAK2 V617F mutation in human myeloproliferative disorders. *Methods MolMed*, 125:253–64.
- Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, Duffy A, Boyd EM, Bench AJ, Scott MA, Vassiliou GS, Milligan DW, Smith SR, Erber WN, Bareford D,

Wilkins BS, Reilly JT, Harrison CN, Green AR; United Kingdom Myeloproliferative Disorders Study Group; Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party; Australasian Leukaemia and Lymphoma Group. (2005). Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: A prospective study. *Lancet*, 366(9501):1945–53.

Cario H. (2005). Childhood polycythemia/erythrocytoses: Classification, diagnosis, clinical presentation, and treatment. *Ann Hematol*, 84(3):137-145.

Cervantes F, Alvarez-Larrán A, Talarin C, Gómez M, Montserrat E. (2002). Myelofibrosis with myeloid metaplasia following essential thrombocythaemia: actuarial probability, presenting characteristics and evolution in a series of 195 patients. *Br J Haematol*, 118:786-90.

Cervantes F, Pereira A, Esteve J, Rafel M, Cobo F, Rozman C, Montserrat E. (1997). Identification of 'short-lived' and 'long-lived' patients at presentation of idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol*, 97(3):635-640.

Cesar JM, Cabello P, Ferro T, Navarro JL. (2006). Emergence of chronic myelogenous leukemia in a patient with primary thrombocythemia and absence of BCR/ABL rearrangement. *Cancer Genet Cytogenet*, 167:74-7.

Chapelle Adl, Traskelin AL, Juvonen E. (1993). Truncated erythropoietin receptor causes dominantly inherited benign human erythrocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(10):4495–4499.

Chen HL, Chiou SS, Sheen JM, Jang RC, Lu CC, Chang TT. (1999). Thrombocytosis in children at one medical center of southern Taiwan. *Acta Paediatr Taiwan*, 40(5):309-313.

Chen X, Vinkemeier U, Zhao Y, Jeruzalmi D, Darnell Jr JE, Kuriyan J. (1998). Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell*, 93(5):827–839.

Cheung B, Radia D, Pantelidis P, Yadergarfar G, Harrison C. (2005). The presence of the JAK2 V617F mutation is associated with a higher haemoglobin and increased risk of thrombosis in essential thrombocythaemia. *Br J Haematol*, 132(2):244-245.

Chuncharunee S, Archararit N, Ungkanont A, Jootar S, Angchaisuksiri P, Bunyaratavej A, Rojanastheini S, Atichartakarn V. (2000). Etiology and incidence of thrombotic and hemorrhagic disorders in Thai patients with extreme thrombocytosis. *J Med Assoc Thai*, 83(Suppl 1):S95-S100.

Collum RG, Brutsaert S, Lee G, Schindler C. (2000). A Stat3-interacting protein (StIP1) regulates cytokine signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(18):10120–10125.

Conchon MR, Costa JL, Novaes MM, Dorlhiac-Llacer PE, de Alencar Fischer Chamone D, Bendit I.(2008). Simultaneous detection of JAK2 V617F mutation and bcr-abl translocation in a patient with chronic myelogenous leukemia. *Int J Hematol*, 88:243-5.

Cotes PM, Doré CJ, Yin JA, Lewis SM, Messinezy M, Pearson TC, Reid C. (1986). Determination of serum immunoreactive erythropoietin in the investigation of erythrocytosis. *N Engl J Med*, 315(5):283-287.

Curtin NJ, Campbell PJ, Green AR.(2005). The Philadelphia translocation and pre-existing myeloproliferative disorders. *Br J Haematol*, 128:734-6.

Dameshek W. (1951). Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*, 6:372-375.

Decker T, Kovarik P, Meinke A. (1997). GAS elements: A few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J Interferon Cytokine Res*, 17(3):121–134.

Dickerman RD, Pertusi R, Zachariah NY, Schaller F. (1998). Androgen-induced erythrocytosis. *Am J Hematol*, 59(3):263-264.

DiMarco AT. (1988). Carbon monoxide poisoning presenting as polycythemia. *N Engl J Med*, 319(13):874.

Dittrich E, Haft CR, Muys L, Heinrich PC, Graeve L. (1996). A di-leucine motif and an upstream serine in the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 mediate ligand-induced endocytosis and down-regulation of the IL-6 receptor. *J Biol Chem*, 271(10):5487–5494.

Drénou B, Le Tulzo Y, Caulet-Maugendre S, Le Guerrier A, Leclercq C, Guilhem I, Lecoq N, Fauchet R, Thomas R. (1995). Pheochromocytoma and secondary erythrocytosis: role of tumour erythropoietin secretion. *Nouv Rev Fr Hematol*, 37(3):197-199.

Dupriez B, Morel P, Demory JL, Lai JL, Simon M, Plantier I, Bauters F. (1996). Prognostic factors in agnogenic myeloid metaplasia: A report on 195 cases with a new scoring system. *Blood*, 88(3):1013-1018.

Ehret GB, Reichenbach P, Schindler U, Horvath CM, Fritz S, Nabholz M, Bucher P. (2001). DNA binding specificity of different STAT proteins. Comparison of in vitro specificity with natural target sites. *J Biol Chem*, 276(9):6675–6688.

European Collaboration on Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera Investigators. (2004). Efficacy and safety of lowdose aspirin in polycythemia vera. *N Engl J Med*, 350(2):114-124.

Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. (1999). The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 341(3):164-172.

Fairbanks VF, Tefferi A. (2000). Normal ranges for packed cell volume and hemoglobin concentration in adults: Relevance to 'apparent polycythemia.' *Eur J Haematol*, 65(5):285-296.

Falik-Zaccai TC, Anikster Y, Rivera CE, Horne MK 3rd, Schliamser L, Phornphutkul C, Attias D, Hyman T, White JG, Gahl WA. (2001). A new genetic isolate of gray platelet syndrome (GPS): Clinical, cellular, and hematologic characteristics. *Mol Genet Metab*, 74(3):303-313.

Fialkow PJ, Denman AM, Jacobson RJ, Lowenthal MN. (1978). Chronic myelocytic leukemia: Origin of some lymphocytes from leukemic stem cells. *J Clin Invest*, 62(4):815-823.

Fialkow PJ, Faguet GB, Jacobson RJ, Vaidya K, Murphy S. (1981). Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell. *Blood*, 58(5):916-919.

Fialkow PJ, Gartler SM, Yoshida A. (1967). Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. *Proc Natl Acad Sci USA*, 58(4):1468-1471.

Fialkow PJ, Jacobson RJ, Papayannopoulou T. (1977). Chronic myelocytic leukemia: Clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *Am J Med*, 63(1):125-130.

Ganti AK, Potti A, Mehdi SA.(2003).Chromosomal anomalies in two coexistent myelo-proliferative disorders. *Cancer Genet Cytogenet*, 145:172-5.

Galacteros F, Rosa R, Prehu MO, Najean Y, Calvin MC. (1984). Diphosphoglyceromutase deficiency: New cases associated with erythrocytosis [in French]. *Nouv Rev Fr Hematol*, 26(2):69-74. In: Tefferi A, Barbui T. (2005). bcr/abl-negative, classic myeloproliferative disorders: Diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*, 80(9):1220-1232.

Girault JA, Labesse G, Mornon JP, Callebaut I. (1998). Janus kinases and focal adhesion kinases play in the 4.1 band: a superfamily of band 4.1 domains important for cell structure and signal transduction. *Mol Med*, 4(12):751-769.

Glicklich D, Kapoian T, Mian H, Gilman J, Tellis V, Croizat H. (1999). Effects of erythropoietin, angiotensin II, and angiotensin-converting enzyme inhibitor on erythroid precursors in patients with posttransplantation erythrocytosis. *Transplantation*, 68(1):62-66.

Golde DW, Bersch N, Cline MJ. (1977). Polycythemia vera: Hormonal modulation of erythropoiesis in vitro. *Blood*, 49(3):399-405.

Gordeuk VR, Stockton DW, Prchal JT. (2005). Congenital polycythemia/erythrocytoses. *Haematologica*, 90(1):109-116.

Greenhalgh CJ, Hilton DJ (2001). Negative regulation of cytokine signaling. *J Leukoc Biol*, 70(3):348-356.

Griffith J, Black J, Faerman C, Swenson L, Wynn M, Lu F, Lippke J, Saxena K. (2004). The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell*, 13(2):169-178.

Gruppo Italiano Studio Policitemia. (1995). Polycythemia vera: The natural history of 1213 patients followed for 20 years. *Ann Intern Med*, 123(9):656-664.

Gupta S, Yan H, Wong LH, Ralph S, Krolewski J, Schindler C. (1996). The SH2 domains of Stat1 and Stat2 mediate multiple interactions in the transduction of IFN-alpha signals. *EMBO J*, 15(5):1075-1084.

Haq AU.(1990).Transformation of polycythemia vera to Ph-positive chronic myelogenous leukemia. *Am J Hematol*, 35:110-3.

Haspel RL, Salditt-Georgieff M, Darnell JE. (1996). The rapid inactivation of nuclear tyrosine phosphorylated Stat1 depends upon a protein tyrosine phosphatase. *EMBO J*, 15(22):6262-6268.

- Hasselbalch H. (1990). Idiopathic myelofibrosis: A clinical study of 80 patients. *Am J Hematol*, 34(4):291-300.
- Hoffstein V, Herridge M, Mateika S, Redline S, Strohl KP. (1994). Hematocrit levels in sleep apnea. *Chest*, 106(3):787-791.
- Hoppin EC, Lewis J P.(1975).Polycythemia rubra vera progressing to Ph1-positive chronic myelogenous leukemia. *Ann Intern Med*, 83:820-3.
- Horvath CM. (2000). STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem Sci*, 25(10):496–502.
- Horvath CM, Stark GR, Kerr IM, Darnell Jr JE. (1996). Interactions between STAT and non-STAT proteins in the interferon-stimulated gene factor 3 transcription complex. *Mol Cell Biol*, 16(12):6957–6964.
- Hsu HC, Wu HS, Hon YC, Wang CC, Yang CF, Chen PM, Lieu CH. (2006). Prevalence of the activating JAK2 tyrosine kinase mutation V617F in Taiwanese patients with myeloproliferative disorders. *Haematologica*, 91(Suppl):457.
- Hubbard SR, Till JH. (2000). Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem*, 69:373–398.
- Hudgson P, Pearce JM, Yeates WK. (1967). Renal artery stenosis with hypertension and high haematocrit. *Br Med J*, 1(5531):18-21.
- Hussein K, Bock O, Seegers A, Flasshove M, Henneke F, Buesche G, Kreipe HH.(2007). Myelofibrosis evolving during imatinib treatment of a chronic myeloproliferative disease with coexisting BCR-ABL translocation and JAK2V617F mutation. *Blood*, 109:4106-7.
- Ihle JN. (2001). The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 13(2):211–217.
- Inoue Y, Matsubara A, Okuya S, Okafuji K, Kaku K, Kaneko T. (1992). Myelofibrosis and systemic lupus erythematosus: Reversal of fibrosis with high-dose corticosteroid therapy. *Acta Haematol*, 88(1):32-36.
- Irie-Sasaki J, Sasaki T, Matsumoto W, Opavsky A, Cheng M, Welstead G, Griffiths E, Krawczyk C, Richardson CD, Aitken K, Iscove N, Koretzky G, Johnson P, Liu P, Rothstein DM, Penninger JM. (2001). CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature*, 409(6818):349–354.

- Isbister JP. (1987). The contracted plasma volume syndromes (relative polycythaemias) and their haemorrhological significance. *Baillieres Clin Haematol*, 1(3):665-693.
- Jackson, PK. (2001). A new RING for SUMO: wrestling transcriptional responses into nuclear bodies with PIAS family E3 SUMO ligases. *Genes Dev*, 15(23):3053-3058.
- Jacobson RJ, Salo A, Fialkow PJ. (1978). Agnogenic myeloid metaplasia: A clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary myelofibrosis. *Blood*, 51(2):189-194.
- Jallades L, Hayette S, Tigaud I, Johnston A, Coiffier B, Magaud JP, Ffrench M.(2008).Emergence of therapy-unrelated CML on a background of BCR-ABL-negative JAK2V617F-positive chronic idiopathic myelofibrosis. *Leuk Res*, 32:1608-10.
- James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garçon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W. (2005). A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*, 434(7037):1144-1148.
- Jamieson CH, Gotlib J, Durocher JA, Chao MP, Mariappan MR, Lay M, Jones C, Zehnder JL, Lilleberg SL, Weissman IL. (2006). The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in polycythemia vera and predisposes toward erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(16):6224–9.
- Jantunen E, Nousiainen T.(1991).The progression of polycythemia vera to chronic my-eloid leukemia. *Duodecim*, 107:641-4.
- Jelinek J, Oki Y, Gharibyan V, Bueso-Ramos C, Prchal JT, Verstovsek S, Beran M, Estey E, Kantarjian HM, Issa JP.(2005).JAK2 mutation 1849G>T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia. *Blood*, 106:3370-3
- Jermanovich NB. (1983). Polycystic kidney disease and polycythemia vera: Occurrence in a patient receiving hemodialysis. *Arch Intern Med*, 143(9): 1822-1823.
- Jiao H, Yang W, Berrada K, Tabrizi M, Shultz L, Yi T. (1997). Macrophages from motheaten and viable motheaten mutant mice show increased proliferative response to

GM-CSF: Detection of potential HCP substrates in GM-CSF signal transduction. *Exp Hematol*, 25(7):592–600.

Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, Score J, Seear R, Chase AJ, Grand FH, White H, Zoi C, Loukopoulos D, Terpos E, Vervessou EC, Schultheis B, Emig M, Ernst T, Lengfelder E, Hehlmann R, Hochhaus A, Oscier D, Silver RT, Reiter A, Cross NC. (2005). Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*, 106(6):2162-2168.

Kawata T, Shevchenko A, Fukuzawa M, Jermyn KA, Totty NF, Zhukovskaya NV, Sterling AE, Mann M, Williams JG. (1997). SH2 signaling in a lower eukaryote: a STAT protein that regulates stalk cell differentiation in dictyostelium. *Cell*, 89(6):909–916.

Kemp NH, Stafford JL, Tanner R.(1964). Chromosome studies during early and terminal chronic myeloid leukaemia. *BMJ*, 1:1010-4.

Kessler DS, Levy DE, Darnell JE. (1988). Two interferon-induced nuclear factors bind a single promoter element in interferon-stimulated genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(22):8521–8525.

Kiely JM, Silverstein MN. (1969). Metastatic carcinoma simulating agnogenic myeloid metaplasia and myelofibrosis. *Cancer*, 24(5):1041-1044.

Kiladjian JJ, Elkassar N, Cassinat B, Hetet G, Giraudier S, Balitrand N, Conejero C, Briere J, Fenaux P, Chomienne C, Grandchamp B. (2006). Essential thrombocythemias without V617F JAK2 mutation are clonal hematopoietic stem cell disorders. *Leukemia*, 20(6):1181–1183.

Kim TK, Maniatis T. (1996). Regulation of Interferon-gamma activated STAT1 by the ubiquitin-proteasome pathway. *Science*, 273(5282):1717–1719.

Kim YK, Shin MG, Kim HR, Yang DH, Cho SH, Lee JJ, Chung IJ, Ryang DW, Kim HJ.(2008). Simultaneous occurrence of the JAK2V617F mutation and BCR-ABL gene rearrangement in patients with chronic myelopro-liferative disorders. *Leuk Res*, 32:993-5.

Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. (2002). Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*, 285(1-2):1-24.

Klingmuller U, Lorenz U, Cantley LC, Neel BG, Lodish HF. (1995). Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell*, 80(5):729–738.

Koulischer L, Fruhling J, Henry J.(1967).Cytogenetic findings in Vaquez' disease. *Eur J Cancer*, 3:193-201.

Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. (2005). A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*, 352(17):1779-1790.

Kralovics R, Teo SS, Li S, Theocharides A, Buser AS, Tichelli A, Skoda RC. (2006). Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood*, 108(4):1377-1380.

Krämer A, Reiter A, Kruth J, Erben P, Hochhaus A, Müller M, Cross NC, Jones AV, Ho AD, Hensel M.(2007).JAK2-V617F mutation in a patient with Philadelphia-chromosome-positive chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol*, 8:658-60.

Krempler A, Qi Y, Triplett AA, Zhu J, Rui H, Wagner KU. (2004). Generation of a conditional knockout allele for the Janus kinase 2 (Jak2) gene in mice. *Genesis*, 40(1):52-57.

Kumbasar B, Taylan I, Kazancioglu R, Agan M, Yenigun M, Sar F. (2004). Myelofibrosis secondary to hyperparathyroidism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 112(3):127-130.

Landgren O, Goldin LR, Kristinsson SY, Helgadóttir EA, Samuelsson J, Björkholm M.(2008). Increased risks of polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myelofibrosis among 24,577 first-degree relatives of 11,039 patients with myeloproliferative neoplasms in Sweden. *Blood*, 112:2199-204.

Leonard W, O'Shea JJ. (1998). JAKS and STATS: Biological implications. *Annu Rev Immunol*, 16:293–322.

Leung S, Li X, Stark GR. (1996). STATs find that hanging together can be stimulating. *Science*, 273(5276):750–751.

Levine RL, Belisle C, Wadleigh M, Zahrieh D, Lee S, Chagnon P, Gilliland DG, Busque L. (2006). X-inactivation based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment

reveals a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. *Blood*, 107(10):4139-4141.

Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG. (2007). Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer*, 7(9):673-683.

Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Fröhling S, Döhner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG. (2005). Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*, 7(4):387-397.

Levy DE, Darnell JE Jr. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(9):651-662.

Macchi P, Villa A, Giliani S, Sacco MG, Frattini A, Porta F, Ugazio AG, Johnston JA, Candotti F, O'Shea JJ, Vezzoni P, Notarangelo LD. (1995). Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID). *Nature*, 377(6544):65-68.

Martin PJ, Najfeld V, Hansen JA, Penfold GK, Jacobson RJ, Fialkow PJ. (1980). Involvement of the B-lymphoid system in chronic myelogenous leukaemia. *Nature*, 287(5777):49-50.

Matsunaga T, Takemoto N, Miyajima N, Okuda T, Nagashima H, Sato T, Terui T, Sasaki H, Ohmi N, Hirayama Y, Tamura Y, Niitsu Y. (2004). Splenic marginal zone lymphoma presenting as myelofibrosis associated with bone marrow involvement of lymphoma cells which secrete a large amount of TGF-beta. *Ann Hematol*, 83(5):322-325.

Matsuyama M, Yamazaki O, Horii K, Higaki I, Kawai S, Mikami S, Higashino M, Oka H, Nakai T, Inoue T. (2000). Erythrocytosis caused by an erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol*, 75(3):197-202.

Mauro MJ, Loriaux M, Deininger M W. (2004). Ph-positive and -negative myeloproliferative syndromes may co-exist. *Leukemia*, 18:1305-7.

McBride KM, McDonald C, Reich NC. (2000). Nuclear export signal located within the DNA-binding domain of the STAT1 transcription factor. *EMBO J*, 19(22):6196-6206.

- McCarthy L, Eichelberger L, Skipworth E, Danielson C. (2002). Erythromelalgia due to essential thrombocythemia. *Transfusion*, 42(10):1245.
- McClure R, Mai M, Lasho T. (2006). Validation of two clinically useful assays for evaluation of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia*, 20(1):168-171.
- Meadows LM, Rosse WR, Moore JO, Crawford J, Laszlo J, Kaufman RE. (1989). Hodgkin's disease presenting as myelofibrosis. *Cancer*, 64(8):1720-1726.
- Meerkin D, Ashkenazi Y, Gottschalk-Sabag S, Hershko C. (1994). Plasma cell dyscrasia with marrow fibrosis: A reversible syndrome mimicking agnogenic myeloid metaplasia. *Cancer*, 73(3):625-628.
- Melzner I, Bucur AJ, Brüderlein S, Dorsch K, Hasel C, Barth TF, Leithäuser F, Möller P. (2005). Biallelic mutation of SOCS-1 impairs JAK2 degradation and sustains phospho-JAK2 action in the MedB-1 mediastinal lymphoma line. *Blood*, 105(6):2535-2542.
- Messinezy M, Westwood NB, El-Hemaidi I, Marsden JT, Sherwood RS, Pearson TC. (2002). Serum erythropoietin values in erythrocytoses and in primary thrombocythaemia. *Br J Haematol*, 117(1):47-53.
- Meydan N, Grunberger T, Dadi H, Shahar M, Arpaia E, Lapidot Z, Leeder JS, Freedman M, Cohen A, Gazit A, Levitzki A, Roifman CM. (1996). Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor. *Nature*, 379(6566):645-648.
- Michel G, Thuret I, Capodano AM, Scheiner C, Guitard AM, Mozziconacci MJ, Fossat C, Perrimond H. (1991). Myelofibrosis in a child suffering from a hypereosinophilic syndrome with trisomy 8: response to corticotherapy. *Med Pediatr Oncol*, 19(1):62-65.
- Milledge JS, Cotes PM. (1985). Serum erythropoietin in humans at high altitude and its relation to plasma renin. *J Appl Physiol*, 59(2):360-364.
- Mitelman E. (1993). The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*, 11(Suppl 1):11-15.
- Mirza I, Frantz C, Clarke G, Voth AJ, Turner R. (2007). Transformation of polycythemia vera to chronic myelogenous leukemia. *Arch Pathol Lab Med*, 131:1719-24.

- Moo-Penn WF, Schneider RG, Shih T, Jones RT, Govindarajan S, Govindarajan PG, Patchen LC. (1980). Hemoglobin Ohio (beta 142 Ala replaced by): a new abnormal hemoglobin with high oxygen affinity and erythrocytosis. *Blood*, 56(2):246-250.
- Mori A, Wada H, Okada M, Takatsuka H, Tamura A, Fujimori Y, Okamoto T, Takemoto Y, Kanamaru A, Kakishita E. (2000). Acute promyelocytic leukemia with marrow fibrosis at initial presentation: Possible involvement of transforming growth factor-beta(1). *Acta Haematol*, 103(4):220-223.
- Mossuz P, Girodon F, Donnard M, Latger-Cannard V, Dobo I, Boiret N, Lecron JC, Binquet C, Barro C, Hermouet S, Praloran V. (2004). Diagnostic value of serum erythropoietin level in patients with absolute erythrocytosis. *Haematologica*, 89(10):1194-1198.
- Mrug M, Julian BA, Prchal JT. (2004). Angiotensin II receptor type 1 expression in erythroid progenitors: Implications for the pathogenesis of postrenal transplant erythrocytosis. *Semin Nephrol*, 24(2):120-130.
- Mui A, Wakao H, O'Farrell AM, Harada N, Miyajima A. (1995). Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 transduce signals through two Stat5 homologues. *EMBO J*, 14(6):1166-1175.
- Murphy S, Peterson P, Iland H, Laszlo J. (1997). Experience of the Polycythemia Vera Study Group with essential thrombocythemia: A final report on diagnostic criteria, survival, and leukemic transition by treatment. *Semin Hematol*, 34(1):29-39.
- Murphy TL, Geissal ED, Farrar JD, Murphy KM. (2000). Role of the Stat4 N domain in receptor proximal tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol*, 20(19):7121-7131.
- Murrin RJ, Harrison P. (2004). Abnormal osteoclasts and bone marrow fibrosis in Paget's disease of the bone. *Br J Haematol*, 124(1):3.
- Ndububa DA, Ojo OS, Adetiloye VA, Rotimi O, Durosinmi MA, Uchegbu LO. (1999). The incidence and characteristics of some paraneoplastic syndromes of hepatocellular carcinoma in Nigerian patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 11(12):1401-1404.
- Neubauer H, Cumano A, Mueller M, Wu H, Huffstadt U, Pfeffer K. (1998). Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell*, 93(3):397-409.

Nomura S, Ogawa Y, Osawa G, Katagiri M, Harada T, Nagahana H. (1996). Myelofibrosis secondary to renal osteodystrophy. *Nephron*, 72(4):683-687.

Nowell PC, Hungerford DA. (1960). Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst*, 25:85-109.

Paquette RL, Meshkinpour A, Rosen PJ. (1994). Autoimmune myelofibrosis: A steroid-responsive cause of bone marrow fibrosis associated with systemic lupus erythematosus. *Medicine (Baltimore)*, 73(3):145-152.

Pardanani A, Lasho TL, Finke C, Hanson CA, Tefferi A. (2007). Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera. *Leukemia*, 21(9):1960-1963.

Pardini S, Fozza C, Contini S, Rimini E, Ottaviani E, Amabile M, Rosti G, Longinotti M. (2008). A case of coexistence between JAK2V617F and BCR /ABL. *Eur J Haematol*, 81:75-6.

Parganas E, Wang D, Stravopidis D, Topham D, Marine JC, Teglund S, Vanin EF, Bodner S, Colamonici OR, Van Deursen JM, Gorsveld G, Ihle JN. (1998). Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell*, 93(3):385-395.

Passamonti F, Malabarba L, Orlandi E, Baratè C, Canevari A, Brusamolino E, Bonfichi M, Arcaini L, Caberlon S, Pascutto C, Lazzarino M. (2003). Polycythemia vera in young patients: a study on the long-term risk of thrombosis, myelofibrosis and leukemia. *Haematologica*, 88:13-8.

Passamonti F, Rumi E, Pungolino E, Malabarba L, Bertazzoni P, Valentini M, Orlandi E, Arcaini L, Brusamolino E, Pascutto C, Cazzola M, Morra E, Lazzarino M. (2004). Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Med*, 117(10):755-761.

Pietra D, Li S, Brisci A, Passamonti F, Rumi E, Theocharides A, Ferrari M, Gisslinger H, Kralovics R, Cremonesi L, Skoda R, Cazzola M. (2008). Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood*, 111(3):1686-1689.

Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, Cuker A, Wernig G, Moore S, Galinsky I, DeAngelo DJ, Clark JJ, Lee SJ, Golub TR, Wadleigh M, Gilliland

- DG, Levine RL. (2006). MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*, 3(7):e270.
- Prchal JT. (2006). Does JAK2 1849G>T initiate polycythemia vera. *Blood*, 108:8-9.
- Prchal JF, Axelrad AA. (1974). Bone-marrow responses in polycythemia vera. *N Engl J Med*, 290(24):1382.
- Preston DL, Kusumi S, Tomonaga M, Izumi S, Ron E, Kuramoto A, Kamada N, Dohy H, Matsuo T, Matsui T [corrected to Matsuo T (1994).incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat Res*, 137(suppl):S68-97.
- Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. (2004). The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci*, 117(Pt 8):1281-1283.
- Reilly JT, Snowden JA, Spearing RL, Fitzgerald PM, Jones N, Watmore A, Potter A. (1997). Cytogenetic abnormalities and their prognostic significance in idiopathic myelofibrosis: A study of 106 cases. *Br J Haematol*, 98(1):96-102.
- Robbins G, Barnard DL. (1983). Thrombocytosis and microthrombocytosis: A clinical evaluation of 372 cases. *Acta Haematol*, 70(3):175-182.
- Rocha Filho FD, Ferreira FV, Mendes Fde O, Ferreira FN, Karbage A, Alencar ML, Costa D. (2000). Bone marrow fibrosis (pseudo-myelofibrosis) in human kala-azar. *Rev Soc Bras Med Trop*, 33(4):363-366.
- Rogers RS, Horvath CM, Matunis MJ. (2003). SUMO modification of STAT1 and its role in PIAS-mediated inhibition of gene activation. *J Biol Chem*, 278(32):30091-30097.
- Roth AD, Oral A, Przepiorka D, Gollin SM, Chervenick PA.(1993).Chronic myelogenous leukemia and acute lymphoblastic leukemia occurring in the course of polycythemia vera. *Am J Hematol*, 43:123-8.
- Rozman C, Giralt M, Feliu E, Rubio D, Cortes MT. (1991). Life expectancy of patients with chronic nonleukemic myeloproliferative disorders. *Cancer*, 67(10):2658-2663.
- Ruiz-Arguelles GJ, Marin-Lopez A, Lobato-Mendizabal E, Ruiz-Arguelles A, Nichols WL, Katzman JA. (1986). Acute megakaryoblastic leukaemia: A prospective study of its identification and treatment. *Br J Haematol*, 62(1):55-63.

- Rushing D, Goldman A, Gibbs G, Howe R, Kennedy BJ. (1982). Hydroxyurea versus busulfan in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Am J Clin Oncol*, 5(3):307-313.
- Saharinen P, Takaluoma K, Silvennoinen O. (2000). Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol Cell Biol*, 20(10):3387-3395.
- Sakai I, Kraft AS. (1997). The kinase domain of Jak2 mediates induction of bcl-2 and delays cell death in hematopoietic cells. *J Biol Chem*, 272(19):12350-12358.
- Santhosh-Kumar CR, Yohannan MD, Higgy KE, al-Mashhadani SA. (1991). Thrombocytosis in adults: Analysis of 777 patients. *J Intern Med*, 229(6): 493-495.
- Schafer AI. (2004). Thrombocytosis. *N Engl J Med*, 350(12):1211-1219.
- Schindler C, Brutsaert S. (1999). Interferons as a paradigm for cytokine signal transduction. *Cell Mol Life Sci*, 55(12):1509–1522.
- Schindler C, Shuai K, Prezioso V, Darnell JE. (1992). Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science*, 257(5071):809–813.
- Schindler C, Strehlow I. (2000). Cytokines and STAT signaling. *Adv Pharmacol*, 47:113-174.
- Scott LM, Campbell PJ, Baxter EJ, Todd T, Stephens P, Edkins S, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA, Green AR. (2005). The V617F JAK2 mutation is uncommon in cancers and in myeloid malignancies other than the classic myeloproliferative disorders. *Blood*, 106(8):2920-2921.
- Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, Futreal PA, Erber WN, McMullin MF, Harrison CN, Warren AJ, Gilliland DG, Lodish HF, Green AR. (2007). JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*, 356(5):459-468.
- Shehata M, Schwarzmeier JD, Hilgarth M, Hubmann R, Duechler M, Gisslinger H. (2004). TGF-beta1 induces bone marrow reticulin fibrosis in hairy cell leukemia. *J Clin Invest*, 113(5):676-685.
- Sheikha A. (2004). Fatal familial infantile myelofibrosis. *J Pediatr Hematol Oncol*, 26(3):164-168.

- Shuai K. (2000). Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene*, 19(21):2638–2644.
- Shuai K, Horvath CM, Huang LH, Qureshi SA, Cowburn D, Darnell Jr JE. (1994). Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell*, 76(5):821–828.
- Shuai K, Liu B. (2003). Regulation of JAK–STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 3(11):900-911.
- Sinclair PB, Nacheva EP, Leversha M, Telford N, Chang J, Reid A, Bench A, Champion K, Huntly B, Green AR. (2000). Large deletions at the t(9;22) breakpoint are common and may identify a poor-prognosis subgroup of patients with chronic myeloid leukemia. *Blood*, 95(3):738-743.
- Sitalakshmi S, Srikrishna A, Damodar P. (2003). Haematological changes in HIV infection. *Indian J Pathol Microbiol*, 46(2):180-183.
- Skultety FM, Sorrell MF, Burklund CW. (1970). Hemangioblastoma of the cerebellum associated with erythrocytosis and an unusual blood supply: Case report. *J Neurosurg*, 32(6):700-705.
- Smith JR, Landaw SA. (1978). Smokers' polycythemia. *N Engl J Med*, 298(1):6-10.
- Sokol L, Luhovy M, Guan Y, Prchal JF, Semenza GL, Prchal JT. (1995). Primary familial polycythemia: A frameshift mutation in the erythropoietin receptor gene and increased sensitivity of erythroid progenitors to erythropoietin. *Blood*, 86(1):15-22.
- Spivak JL. (2001). Erythropoietin use and abuse: When physiology and pharmacology collide. *Adv Exp Med Biol*, 502:207-224.
- Steensma DP. (2006). JAK2 V617F in myeloid disorders: Molecular diagnostic techniques and their clinical utility: A paper from the 2005 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. *J Mol Diagn*, 8(4):397-411.
- Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, Powell HL, McClure RF, Levine RL, Gilliland DG, Tefferi A. (2005). The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both “atypical” myeloproliferative disorders and the myelodysplastic syndrome. *Blood*, 106(4):1207-1209.

- Steensma DP, Hanson CA, Letendre L, Tefferi A. (2001). Myelodysplasia with fibrosis: A distinct entity? *Leuk Res*, 25(10):829-838.
- Strehlow I, Schindler C. (1998). Amino terminal signal transducer and activator of transcription (STAT) domains regulate nuclear translocation and STAT deactivation. *J Biol Chem*, 273(43):28049–28056.
- Suzuki M, Takamizawa S, Nomaguchi K, Suzu S, Yamada M, Igarashi T, Sato I. (2001). Erythropoietin synthesis by tumour tissues in a patient with uterine myoma and erythrocytosis. *Br J Haematol*, 113(1):49-51.
- Tefferi A. (2000). Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *N Engl J Med*, 342:1255-1265.
- Tefferi A. (2003). Polycythemia vera: A comprehensive review and clinical recommendations. *Mayo Clin Proc*, 78(2):174-194.
- Tefferi A, Barbui T. (2005). bcr/abl-negative, classic myeloproliferative disorders: Diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*, 80(9):1220-1232.
- Tefferi A, Gilliland DG. (2006). Classification of myeloproliferative disorders: From Dameshek towards a semi-molecular system. *Best Pract Res Clin Haematol*, 19(3):365-85.
- Tefferi A, Hoagland HC, Therneau TM, Pierre RV. (1989). Chronic myelomonocytic leukemia: natural history and prognostic determinants. *Mayo Clin Proc*, 64(10):1246-1254.
- Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, Steensma DP, Mesa RA, Li CY, Wadleigh M, Gary Gilliland D. (2005). The JAK2(V617F) tyrosine kinase mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: lineage specificity and clinical correlates. *Br J Haematol*, 131(3):320-328.
- Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, Strand JS, Elliott M, Mesa R, Li CY, Wadleigh M, Lee SJ, Gilliland DG. (2005). The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous JAK2(V617F) in polycythemia vera. *Cancer*, 106(3):631-635.
- Tefferi A, Mesa RA, Schroeder G, Hanson CA, Li CY, Dewald GW. (2001). Cytogenetic findings and their clinical relevance in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol*, 113(3):763-771.
- Tefferi A, Murphy S. (2001). Current opinion in essential thrombocythemia: Pathogenesis, diagnosis, and management. *Blood Rev*, 15(3):121-131.

Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA, Barosi G, Verstovsek S, Birgegard G, Mesa R, Reilly JT, Gisslinger H, Vannucchi AM, Cervantes F, Finazzi G, Hoffman R, Gilliland DG, Bloomfield CD, Vardiman JW. (2007). Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: Recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood*, 110(4):1092-1097.

Thiele J, Krech R, Vykoupil KF, Georgii A. (1984). Malignant (acute) myelosclerosis -- a clinical and pathological study in 6 patients. *Scand J Haematol*, 33(1):95-109.

Thiele J, Kvasnicka HM, Zankovich R, Diehl V. (2001). The value of bone marrow histology in differentiating between early stage polycythemia vera and secondary (reactive) polycythemia. *Haematologica*, 86(4):368-374.

Tyndall MR, Teitel DF, Lutin WA, Clemons GK, Dallman PR. (1987). Serum erythropoietin levels in patients with congenital heart disease. *J Pediatr*, 110(4):538-544.

Ugo V, Marzac C, Teyssandier I, Larbret F, Lécluse Y, Debili N, Vainchenker W, Casadevall N. (2004). Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. *Exp Hematol*, 32(2):179-187.

Vanuxem D, Guillot C, Fornaris E, Weiller PJ, Grimaud C. (1977). Secondary polycythaemia in chronic respiratory insufficiency. *Thorax*, 32(3):317-321.

Velazquez L, Mogensen KE, Barbieri G, Fellous M, Uze G, Pellegrini S. (1995). Distinct domains of the protein tyrosine kinase tyk2 required for binding of Interferon- α/β and signal transduction. *J Biol Chem*, 270(7):3327-3334.

Verfaillie CM. (1998). Biology of chronic myelogenous leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*, 12(1):1-29.

Viallard JF, Parrens M, Boiron JM, Texier J, Mercie P, Pellegrin JL. (2002). Reversible myelofibrosis induced by tuberculosis. *Clin Infect Dis*, 34(12): 1641-1643.

Vinkemeier U, Cohen SL, Moarefi I, Chait BT, Kuriyan J, Darnell JE. (1996). DNA binding of in vivo activated Stat1 α , Stat1 β and truncated Stat1: Interaction between NH₂-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. *EMBO J*, 15(20):5616-5626.

- Vinkemeier U, Moarefi I, Darnell Jr JE, Kuriyan J. (1998). Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4. *Science*, 279(5353):1048–1052.
- Vu BV, Litvinov D, Willson RC. (2008). Gold nanoparticle effects in polymerase chain reaction: Favoring of smaller products by polymerase adsorption. *Anal Chem*, 80(14):5462-5467.
- Wahlin A, Golovleva I.(2003).Emergence of Philadelphia positive chronic myeloid leukaemia during treatment with hydroxyurea for Philadelphia negative essential thrombocythaemia. *Eur J Haematol*, 70:240-1.
- Wallis JP, Reid MM. (1989). Bone marrow fibrosis in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *J Clin Pathol*, 42(12):1253-1254.
- Wang D, Moriggl R, Stravopodis D, Carpino N, Marine JC, Teglund S, Feng J, Ihle JN. (2000). A small amphipathic alpha-helical region is required for transcriptional activities and proteasome-dependent turnover of the tyrosine-phosphorylated Stat5. *EMBO J*, 19(3):392-399.
- Wang JYJ. (1993). Abl tyrosine kinase in signal transduction and cell cycle regulation. *Curr Opin Genet Dev*, 3(1):35-43.
- Wasserman LR. (1971). The management of polycythaemia vera. *Br J Haematol*, 21(4):371-376.
- Weinstein RS. (1991). Parathyroid carcinoma associated with polycythemia vera. *Bone*, 12(4):237-239.
- Wickre CG, Norman DJ, Bennison A, Barry JM, Bennett WM. (1983). Postrenal transplant erythrocytosis: A review of 53 patients. *Kidney Int*, 23(5): 731-737.
- Wiesener MS, Seyfarth M, Warnecke C, Jürgensen JS, Rosenberger C, Morgan NV, Maher ER, Frei U, Eckardt KU. (2002). Paraneoplastic erythrocytosis associated with an inactivating point mutation of the von Hippel-Lindau gene in a renal cell carcinoma. *Blood*, 99(10):3562-3565.
- Williams DM, Kim AH, Rogers O, Spivak JL, Moliterno AR. (2007). Phenotypic variations and new mutations in JAK2 V617F-negative polycythemia vera, erythrocytosis, and idiopathic myelofibrosis. *Exp Hematol*, 35(11):1641-1646.

- Wolanskyj AP, Lasho TL, Schwager SM, McClure RF, Wadleigh M, Lee SJ, Gilliland DG, Tefferi A. (2005). JAK2V617F mutation in essential thrombocythaemia: Clinical associations and long-term prognostic relevance. *Br J Haematol*, 131(2):208-213.
- Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF. (1995). Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell*, 83(1):59–67.
- Xie S, Wang Y, Liu J, Sun T, Wilson MB, Smithgall TE, Arlinghaus RB.(2001).Involvement of Jak2 tyrosine phosphorylation in bcr-abl transformation. *Oncogene*, 20:6188-95.
- Xu X, Sun YL, Hoey T. (1996). Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science*, 273(5276):794–797.
- Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, Holt VE III, Silvennoinen O, O’Shea JJ. (2004). The Janus kinases (Jaks). *Genome Biol*, 5(12):253.
- Yang E, Wen Z, Haspel RL, Zhang JJ, Darnell Jr JE. (1999). The linker domain of Stat1 is required for gamma interferon-driven transcription. *Mol Cell Biol*, 19(7):5106–5112.
- Yeh TC, Dondi E, Uze G, Pellegrini S. (2000). A dual role for the kinase-like domain of the tyrosine kinase Tyk2 in interferon-alpha signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(16):8991–8996.
- Yi T, Mui AL, Krystal G, Ihle JN. (1993). Hematopoietic cell phosphatase associates with the interleukin-3 (IL-3) receptor beta chain and down-regulates IL-3-induced tyrosine phosphorylation and mitogenesis. *Mol Cell Biol*, 13(12):7577–7586.
- Yohannan MD, Higgy KE, al-Mashhadani SA, Santhosh-Kumar CR. (1994). Thrombocytosis: Etiologic analysis of 663 patients. *Clin Pediatr (Phila)*, 33(6):340-343.
- Yu CL, Burakoff SJ. (1997). Involvement of proteasomes in regulating Jak-STAT pathways upon interleukin-2 stimulation. *J Biol Chem*, 272(22):14017–14020.
- Yu CL, Jin YJ, Burakoff SJ. (2000). Cytosolic tyrosine dephosphorylation of STAT5. Potential role of SHP-2 in STAT5 regulation. *J Biol Chem*, 275(1):599–604.

Zanjani ED, Lutton JD, Hoffman R, Wasserman LR. (1977). Erythroid colony formation by polycythemia vera bone marrow in vitro: Dependence on erythropoietin. *J Clin Invest*, 59(5):841-848.

Zhang JG, Farley A, Nicholson SE, Willson TA, Zugaro LM, Simpson RJ, Moritz RL, Cary D, Richardson R, Hausmann G, Kile BJ, Kent SB, Alexander WS, Metcalf D, Hilton DJ, Nicola NA, Baca M. (1999). The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(5):2071–2076.

Zhang T, Kee WH, Seow KT, Fung W, Cao X. (2000). The coiled-coil domain of Stat3 is essential for its SH2 domain-mediated receptor binding and subsequent activation induced by epidermal growth factor and interleukin-6. *Mol Cell Biol*, 20(19):7132–7139.

Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, Zhao ZJ. (2005). Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem*, 280(24):22788-22792.

Zhu M-H, John S, Berg M, Leonard WJ. (1999). Functional association of Nmi with Stat5 and Stat1 in IL-2 and IFN γ mediated signaling. *Cell*, 96(1):121–130.

9.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Güven	Soyadı	Yenmiş
Doğum Yeri	İskenderun	Doğum Tarihi	14. 06. 1982
Uyruğu	T. C .	TC Kimlik No	11 243 327 328
E-mail	guven.yenmis@yahoo.com	Tel	+90 535 787 73 37

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	Boğaziçi Üniversitesi	2006
Lise	İskenderun Lisesi	1999

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Moleküler Biyolog	Acıbadem Genetik Tanı Merkezi	2006-2010
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu #

KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

Başarılımış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları/Ödülleri/Diğer